

MÁRCIA LIMA MOURA

FISIOLOGIA DO AMADURECIMENTO DE TOMATES 'SANTA
CLARA' E SEU MUTANTE NATURAL 'FIRME'

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do título
de "Doctor Scientiae"

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

MÁRCIA LIMA MOURA

FISIOLOGIA DO AMADURECIMENTO DE TOMATES 'SANTA CLARA' E SEU MUTANTE NATURAL 'FIRME'

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Doctor Scientiae"

APROVADA: 22 de março de 2002.

Prof. Rolf Puschmann
(Conselheiro)

Prof. Derly José Henriques da Silva
(Conselheiro)

Prof. Paulo Roberto Cecon

Dr. Sérgio Agostinho Cenci

Prof. Fernando Luiz Finger

Dedico este trabalho à nova geração:

Ignacio Moura Hue,

João Yerab Moura Carneiro e

Lucas Lima Lourenço

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fisiologia Vegetal, à FAPEMIG e ao CNPq, pela oportunidade de realizar este Curso.

Aos meus pais Sylvio da Silva Moura e Léia dos Santos Lima, pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos pela paciência e amizade.

Ao meu professor, orientador e amigo Fernando Luiz Finger, pelos constantes ensinamentos, orientações e amizade.

Aos professores Donald J. Huber e Steven A. Sargent, da Universidade da Florida, e Derly José Henriques da Silva e Rolf Puschmann, da UFV, pelos valiosos conselhos.

Aos técnicos de laboratório James Lee, da Universidade da Florida, Ribeiro, Geraldo e Sabino, da UFV, pela ajuda nos experimentos.

Aos amigos Muharrem, Yasser, Paulo José, Gisele, Rosilene e Hilton, pelo companheirismo no laboratório.

Aos amigos Mônica, Sérgio, Dilma Daniela e Denis, pela amizade e paciência nas coisas do dia a dia.

Ao Álvaro por tudo.

BIOGRAFIA

Márcia Lima Moura nasceu no Rio de Janeiro, RJ, em 03 de fevereiro de 1972. Coursou o ensino básico e médio no Colégio Santo Agostinho, Rio de Janeiro, RJ, e graduou-se engenheira agrônoma pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em janeiro de 1994. Seguiu seu aprendizado acadêmico com o mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-USP, Piracicaba, SP, e completa agora o curso de doutorado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO..... | viii |
| ABSTRACT..... | x |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 5 |
| ARTIGO 1..... | 7 |
| Alterações da cor durante o amadurecimento de tomates cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme': Aspectos visuais, carotenóides e ultraestrutura | |
| RESUMO..... | 8 |
| ABSTRACT..... | 9 |
| 1.0 - INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2.0 - MATERIAL E MÉTODOS..... | 14 |
| 3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 18 |
| 3.1 - Coloração da epiderme..... | 18 |
| 3.2 - Produção de carotenóides..... | 21 |
| 3.3 - Ultraestrutura..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 4.0 - CONCLUSÕES..... | 30 |
| 5.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 31 |
| APÊNDICE..... | 35 |
| ARTIGO 2..... | 36 |
| Mudanças fisiológicas durante o amadurecimento na planta de frutos de tomateiros ‘Santa Clara’ e de seu mutante ‘Firme’ | |
| RESUMO..... | 37 |
| ABSTRACT..... | 38 |
| 1.0 - INTRODUÇÃO..... | 39 |
| 2.0 - MATERIAL E MÉTODOS..... | 43 |
| 3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 47 |
| 4.0 - CONCLUSÕES..... | 55 |
| 5.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 56 |
| APÊNDICE..... | 61 |
| ARTIGO 3..... | 62 |
| Efeito da aplicação de etileno no amadurecimento pós-colheita de frutos de tomate cv. Santa Clara e seu mutante natural ‘Firme’ | |
| RESUMO..... | 63 |
| ABSTRACT..... | 64 |
| 1.0 - INTRODUÇÃO..... | 65 |
| 2.0 - MATERIAL E MÉTODOS..... | 67 |
| 3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 70 |
| 4.0 - CONCLUSÕES..... | 82 |
| 5.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 83 |
| APÊNDICE..... | 87 |

CONCLUSÕES GERAIS.....

88

RESUMO

MOURA, Márcia Lima, D.S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2002.
Fisiologia do amadurecimento de tomates ‘Santa Clara’ e seu mutante natural ‘Firme’. Orientador: Fernando Luiz Finger. Conselheiros: Rolf Puschmann e Derly José Henriques da Silva.

As mutações espontâneas na espécie *Lycopersicon esculentum* têm sido muito utilizadas pelos melhoristas como fonte de variabilidade genética com o objetivo de produzir tomates que apresentem maior resistência ao manuseio pós-colheita. Na região produtora de hortaliças de Viçosa, MG, identificaram-se plantas de tomate ‘Santa Clara’ cujos frutos apresentam coloração “amarelo-creme” quando imaturos e diversos aspectos de seu amadurecimento alterados. O objetivo do presente trabalho foi de estudar as alterações fisiológicas, visuais e ultraestruturais em frutos de tomateiro do cv. Santa Clara e seu mutante natural ‘Firme’ durante o amadurecimento na planta e o efeito da aplicação de etileno em frutos colhidos no estágio verde-maduro. Durante o amadurecimento na planta, os frutos ‘Santa Clara’ apresentaram mudança de cor da epiderme mais gradual e menos intensa do que os frutos mutantes, que apresentaram maior intensidade de cor vermelha nos últimos estádios de maturidade; observou-se aumento nos teores de carotenóides totais e licopeno de mais de 20 vezes tanto para frutos normais como para frutos mutantes. Os estudos de ultraestrutura evidenciaram que durante o amadurecimento de tomates ‘Santa Clara’ os cloroplastos pré-existentes se diferenciam em cromoplastos; por outro lado, no mutante ‘Firme’ a diferenciação em cromoplastos pode ocorrer inteiramente independente da

presença de cloroplastos. Os frutos mutantes, durante o amadurecimento na planta, apresentaram menor produção de CO₂ e etileno em todos os estádios de amadurecimento; apesar da atividade da oxidase do ACC ter apresentado padrão de comportamento distinto durante o amadurecimento na planta entre frutos mutantes e normais, a magnitude da atividade foi a mesma. Frutos mutantes apresentaram atraso no aumento da atividade da enzima poligalacturonase em relação aos frutos normais. Os frutos normais acumularam açúcares durante seu amadurecimento na planta, enquanto que os frutos mutantes perderam açúcares com o amadurecimento, sendo que estes apresentaram teores de açúcares totais menores do que os de tomates normais tanto no pericarpo quanto no tecido locular. As mudanças fisiológicas características do amadurecimento dos frutos de tomate, como a perda de firmeza e a mudança de cor, foram influenciadas de maneira semelhante pela aplicação de etileno em frutos colhidos no estágio verde-maduro e armazenados a temperatura ambiente tanto para frutos normais como para frutos mutantes, o que indica que a sensibilidade do tecido ao etileno não foi alterada pela mutação. Os frutos mutantes apresentaram atraso na produção autocatalítica de etileno em relação aos frutos normais após a aplicação de etileno. A menor dose de etileno, 100 µL.L⁻¹, foi suficiente para acelerar o amadurecimento dos frutos do cv. Santa Clara assim como de seu mutante natural 'Firme'.

ABSTRACT

MOURA, Márcia Lima, D.S. Universidade Federal de Viçosa, March, 2002.
Ripening physiology of 'Santa Clara' tomato and its mutant 'Firme'.
Advisor: Fernando Luiz Finger. Committee members: Rolf Puschmann and
Derly José Henriques da Silva.

Breeders have been using natural mutants of *Lycopersicon esculentum* species as source of genetic variability to enhance tomato fruit postharvest life. 'Santa Clara' tomato plants showing pale-yellow fruits and others fruit ripening aspects changed were found in Viçosa, MG. The aim of this work was to study the physiological, visual, and ultrastructural changes during ripening of 'Santa Clara' and 'Firme' fruits attached to the plant and the effect of exogenous ethylene on ripening of mature green fruit. 'Santa Clara' fruit showed a more gradual and less intense change on skin color than mutant fruit; we reported a rise higher than twenty fold in total carotenoids and lycopene levels during fruit ripening for 'Santa Clara' and 'Firme' fruits. Ultrastructure studies provide evidence that during 'Santa Clara' tomato fruit ripening chromoplast indeed differentiate from preexisting chloroplast; on the other hand, chromoplast differentiation in mutant fruit indicates that chromoplast development can be a process entirely independent of the chloroplast. Mutant fruit showed lower ethylene and CO₂ production at all maturity stages. ACC oxidase activity showed a distinct pattern during ripening of attached wild type and mutant fruits, nevertheless, the amount found for mutant and wild type were practically the same. Mutant fruit showed a delay on poligalacturonase activity rise comparing

to wild type fruit. While wild type fruit showed a rise on total soluble sugars content during ripening mutant fruit showed a decrease on it, nevertheless, mutant fruit showed lower levels than wild type fruit for locular and pericarp total soluble sugars content at all maturity stages. Physiological changes during tomato fruit ripening, such as firmness loss and color change, were effected in a similar way by application of exogenous ethylene on mature green fruit stored at room temperature for mutant and wild type fruit, indicating that mutation did not change tissue ethylene-sensitivity. Mutant fruit showed a delay on autocatalytic ethylene production after application of exogenous ethylene when compared to 'Santa Clara' fruit. The lower ethylene concentration studied, $100 \mu\text{LL}^{-1}$, enhanced ripening of 'Santa Clara' and 'Firme' fruits.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, assim como em diversos países do mundo, o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma olerícola de grande importância econômica. A região sudeste é a maior produtora brasileira, estando São Paulo e Minas Gerais em primeiro e segundo lugar, respectivamente, segundo dados do Censo Agropecuário de 1996 do IBGE. Dados do Instituto de Economia Agrícola de São Paulo (1999) mostram que cerca de 13.000 hectares, somando-se as áreas de tomate envarado e rasteiro, foram plantados no ano de 1999, valor muito elevado se considerado o fato do tomate ser uma olerícola. Mesmo não sendo qualificado como uma rica fonte de nutrientes essenciais, em comparação às outras olerícolas, o tomate é apontado como um dos itens que fornece maiores teores de vitaminas A e C à dieta humana, devido ao seu elevado consumo *per capita*, especialmente nos países desenvolvidos. Além da sua importância econômica e nutricional, a planta e o fruto do tomateiro são considerados como modelos em estudos fisiológicos, bioquímicos e genéticos.

O tomate é um produto perecível e, como tal, apresenta diversos problemas durante seu transporte, armazenamento e comercialização, isto é, durante o sistema de manuseio pós-colheita. Com o intuito de reduzir as perdas durante esses processos muitos têm sido os estudos realizados visando aumentar a resistência desses frutos ao manuseio pós-colheita. Atualmente, a manipulação da variabilidade genética, por meio de mutações, recombinações genéticas e transformações via técnica de DNA recombinante, tem sido uma importante ferramenta para obtenção de frutos mais resistentes.

Os mutantes naturais representam para os melhoristas uma das principais fontes de variabilidade genética. Os mutantes pleiotrópicos *Never ripe* (*Nr*), *non-ripening* (*nor*), *ripening inhibitor* (*rin*) e *alcobaça* (*alc*), por exemplo, apresentam frutos com reduzido amolecimento, menor produção de etileno e alterações de cor menos intensas durante o amadurecimento. Esses mutantes têm sido usados como potenciais doadores de genes em programas de melhoramento que visam obter frutos com melhor conservação pós-colheita e também em estudos que visam entender melhor os processos fisiológicos que ocorrem durante o amadurecimento de frutos de tomate.

Na região produtora de hortaliças de Viçosa, MG, foram identificadas plantas de tomate da cv. Santa Clara cujos frutos apresentam coloração “amarelo-creme” quando jovens e vermelha quando maduros, maturação lenta e frutos mais firmes do que os frutos normais (MOURA, 1999; MOURA et al., 2002). Trabalhos anteriores mostraram que esta é uma mutação estável em um único gene recessivo no cromossomo 10, na região do gene *lutescent-2*, que apresenta efeitos pleiotrópicos (SCHUELTER et al., 1998a, b; SCHUELTER, 1999). Análises dessa mutação revelaram sua importância em programas de melhoramento interpopulacionais visando à obtenção de genótipos com maior potencial de conservação pós-colheita. Deste modo, o estudo das modificações fisiológicas, decorrente do amadurecimento na planta de tomates cv. Santa Clara e seu mutante natural ‘Firme’, pode vir a fornecer novas informações que futuramente poderão ser utilizadas no melhoramento desta espécie visando um fruto mais resistente ao manuseio pós-colheita.

Várias são as mudanças que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos de tomateiro, entre elas estão a mudança na cor, a perda de firmeza e as

alterações no sabor e no odor. Segundo KHUDAIRI (1972), durante o amadurecimento dos tomates dois processos ocorrem relacionados à mudança de cor dos frutos: a degradação da clorofila e a produção de carotenóides, responsáveis pela coloração vermelha (licopeno) e amarela (outros carotenóides) de frutos maduros. A degradação da clorofila se deve à perda da cadeia fitol causada pela ação da enzima clorofilase e a produção de carotenóides é regulada principalmente pelas enzimas sintase do fitoeno e a fitoeno desaturase, responsáveis, respectivamente, pela síntese do fitoeno, primeiro carotenóide formado, e pela transformação do fitoeno em licopeno. Além disso, durante o amadurecimento ocorrem mudanças na ultraestrutura dos frutos relacionadas com a alteração da cor, onde os cloroplastos pré-existentes se transformam em estruturas específicas de armazenamento de carotenóides, os cromoplastos.

Um dos primeiros sinais do amadurecimento é o aumento na taxa de produção de etileno associado ao aumento climatérico da respiração. Não há dúvidas de que o etileno tem uma importância primordial no controle e coordenação do amadurecimento em frutos climatéricos, como é o caso do tomate. O papel do etileno na regulação do amadurecimento de tomate tem recebido uma atenção especial dos pesquisadores, não apenas pelo interesse científico, mas também pela conveniência experimental e importância da cultura do tomate no mundo.

Estudos realizados recentemente com tomates transgênicos, com gene antisense para a enzima sintase do ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), uma das enzimas relacionadas à biossíntese de etileno, sugerem que o acúmulo de mRNA de poligalacturonase, principal enzima responsável

pelo processo de perda de firmeza de frutos, é regulada pela presença de etileno (SITRIT & BENNETT, 1998). A perda de firmeza é um processo que acompanha o amadurecimento de muitos frutos, inclusive o tomate, e é resultado de mudanças estruturais que ocorrem na parede celular. A associação das mudanças na estrutura da pectina presente na parede celular com o amadurecimento vem sendo extensivamente documentada (LABAVITCH, 1981; HUBER, 1983; HUBER & O'DONOGHUE, 1993).

Entre as substâncias orgânicas presentes nos frutos de tomate, os açúcares e ácidos orgânicos são os constituintes mais importantes para o desenvolvimento do sabor do fruto, e que afetam diretamente a qualidade do produto. Uma vez que nas variedades comerciais de tomate os açúcares constituem 1,5 a 4,5% do peso fresco, isto é, cerca de 65% dos sólidos solúveis totais, eles têm grande importância no sabor do fruto maduro (HOBSON & DAVIES, 1971).

O objetivo do presente trabalho foi de estudar as alterações fisiológicas, visuais, ultraestruturais em frutos de tomateiro do cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme' durante o amadurecimento na planta e o efeito da aplicação de etileno exógeno em frutos colhidos no estágio verde-maduro, visando à obtenção de maiores informações sobre essa mutação que poderão ser utilizadas como base para futuros trabalhos de melhoramento da espécie cultivada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- IBGE - Censo Agropecuário. Quantidade produzida (tonelada) de tomate em 1996, por unidade da federação. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**, 1996. www.sidra.ibge.gov.br/bda
- INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA DE SÃO PAULO. Estatística da produção vegetal, por escritório de desenvolvimento rural, Estado de São Paulo, 1999. **Instituto de Economia Agrícola e Coordenadoria de Assistência Técnica Integral**, 1999. www.iea.sp.gov.br
- HOBSON, G.E. & DAVIES, J.N. The tomato. IN: HULME, A.C. **The Biochemistry of fruits and their products**. Academic Press, London, v. 2, cap. 13, p. 437-475, 1971.
- HUBER, D.J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural Review**, v. 5, p. 169-219, 1983.
- HUBER, D.J. & O'DONOGHUE, E.M. Polyuronides in avocado (*Persea americana* L.) and tomato fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. **Plant Physiology**, v. 102, p. 473-488, 1993.
- KHUDAIRI, A.K. The ripening of tomatoes. A molecular ecological approach to the physiology of fruit ripening. **American Scientist**, v. 60, n. 6, p. 696-707, 1972.
- LABAVITCH, J.M. Cell wall turnover in plant development. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 32, p. 385-406, 1981.

- MOURA, M.A. **Crescimento e pós-colheita de frutos do tomateiro cv. Santa Clara e do seu mutante firme**. Viçosa: UFV, 1999. 86 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- MOURA, M.L.; MOURA, M.A.; PINTO, C.M.F.; FINGER, L.F. Amadurecimento de frutos de tomateiro cv. Santa Clara e de seu mutante natural 'Firme'. **Revista Brasileira de Armazenamento**, 2002. (no prelo)
- SCHUELTER, A.R. **Análise genética e da pós-colheita de um mutante de tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.)**. Viçosa: UFV, 1999. 135 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; FINGER, F.L.; CRUZ, C.D.; COELHO, A.D.F. Analysis of mendelian segregation in a natural occurred tomato mutant. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 217, 1998a.
- SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; FINGER, F.L.; SPRITZE, A.L. Herança de um mutante de tomate que condiciona modificações em características morfológicas e fisiológicas. **Horticultura Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 96. 1998b.
- SITRIT, Y. & BENNETT. A.B. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: A re-examination. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1145-1150, 1998.

ARTIGO 1

***ALTERAÇÕES DA COR DURANTE O AMADURECIMENTO DE TOMATES
CV. SANTA CLARA E SEU MUTANTE NATURAL 'FIRME': ASPECTOS
VISUAIS, CAROTENÓIDES E ULTRAESTRUTURA***

RESUMO

Durante o amadurecimento de frutos de tomate ocorrem mudanças na cor da epiderme que estão associadas com a degradação da clorofila, o acúmulo de carotenóides e a diferenciação de cromoplastos. Este trabalho teve por objetivo estudar as alterações visuais da cor da epiderme dos frutos, as modificações nos teores de carotenóides e as mudanças ocorridas durante a diferenciação de cromoplastos durante o amadurecimento na planta de tomates do cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme'. Os frutos 'Santa Clara' apresentaram mudança de cor da epiderme mais gradual e menos intensa do que os frutos mutantes, que apresentaram maior intensidade de cor vermelha nos últimos estádios de maturidade. Observou-se aumento nos teores de carotenóides totais e licopeno de mais de 20 vezes tanto para frutos normais como para frutos mutantes durante o amadurecimento na planta. Frutos do mutante 'Firme' apresentaram teores de carotenóides, principalmente de licopeno, mais baixos do que os frutos do cv. Santa Clara nos últimos estádios de maturidade devido provavelmente a uma menor produção de etileno pelos mutantes. Os estudos de ultraestrutura evidenciaram que durante

o amadurecimento de tomates 'Santa Clara' os cloroplastos pré-existentes se diferenciam em cromoplastos; por outro lado, no mutante 'Firme' a diferenciação em cromoplastos pode ocorrer inteiramente independente da presença de cloroplastos.

ABSTRACT

Tomato color change during fruit ripening is closely associated with chlorophyll degradation, carotenoid accumulation, and chromoplast differentiation. The aim of this work was to study the difference within 'Santa Clara' tomato and its natural mutant 'Firme' during ripening of attached fruit on visual aspects of color, carotenoids content, and chromoplast differentiation. 'Santa Clara' fruit showed a more gradual and less intense change on skin color than mutant fruit. On the other hand, mutant fruit showed more intense red coloration when picked in later maturity stages. We reported a rise higher than twenty fold in total carotenoids and lycopene levels during fruit ripening for 'Santa Clara' and 'Firme' fruits. Mutant fruit showed lower levels of carotenoids, mainly lycopene, than normal fruit when picked in later maturity stages probably due to a lower ethylene production. Ultrastructure studies provide evidence that during 'Santa Clara' tomato fruit ripening chromoplast indeed differentiate from preexisting chloroplast; on the other hand, chromoplast differentiation in mutant fruit indicates that chromoplast development can be a process entirely independent of the chloroplast.

1.0 - INTRODUÇÃO

Os principais tipos de pigmentos presentes em frutos são as clorofilas, carotenóides e antocianinas. Nos frutos de tomate, a cor verde deve-se a presença de clorofilas *a* e *b*, que são lipossolúveis e estão localizadas na porção lipídica da grana nos cloroplastos. Segundo KHUDAIRI (1972), durante o amadurecimento dos tomates dois processos ocorrem: a degradação da clorofila e a produção de carotenóides, responsáveis pela coloração vermelha (licopeno) e amarela (outros carotenóides) de frutos maduros. A degradação da clorofila se deve à perda da cadeia fitol causada pela ação da clorofilase. Após a destruição da clorofila, o fitol pode ser resintetizado a geranilgeranil difosfato e então transformado em carotenóide.

Durante o desenvolvimento das plantas, os carotenóides têm duas funções principais, a de proteger os tecidos verdes da fotoxidação e a de dar cor a flores e frutos. Nos tecidos fotossintetizantes, quando o fotosistema fica saturado, as moléculas de clorofila presentes na antena captadora de energia do fotosistema podem reagir com o oxigênio produzindo o oxigênio singleto, que leva a reações oxidativas letais. Os carotenóides previnem a formação de oxigênio singleto pela absorção da energia das moléculas de clorofila excitadas (KRINSKY, 1979). Nos frutos e flores por sua vez, os carotenóides contribuem para a coloração amarela e vermelha que têm a função de atrair animais para a polinização e dispersão de sementes. Além disso, os carotenóides podem ser metabolizados e transformados em ácido abscísico em plantas e em vitamina A em células animais.

Os carotenóides são polienos que possuem cadeias com 40 carbonos que estão presentes nos cromoplastos dos frutos e, segundo VISHNEVETSKY et al. (1999), podem estar associados a complexos lipo-proteicos. Os carotenóides podem ser divididos em carotenos cíclicos, como o β -caroteno (laranja), ou acíclicos, como o licopeno (vermelho), e xantofilas (amarela), que são compostos oxigenados. O precursor dos carotenóides é o ácido mevalônico, que forma o geranylgeranyl difosfato, que se transforma no primeiro carotenóide, o fitoeno – um composto incolor –, a partir da ação da enzima sintase do fitoeno. Segundo BARTLEY et al. (1992) a sintase do fitoeno é uma proteína periférica associada à membrana dos plastídios, que em frutos é codificada ao nível do DNA nuclear pelo gene *Psy1*. FRASER et al. (2000) observaram que esta enzima está associada a um complexo proteico que contém outras enzimas como a isopentenil difosfato isomerase e a geranylgeranyl difosfato isomerase, e que para a sua ação catalítica é essencial à combinação de Mn^{2+} e ATP. Outra importante enzima ligada à biossíntese de carotenóides em tomate é a fitoeno desaturase, que catalisa a conversão de fitoeno a β -caroteno, precursor direto do licopeno. GIULIANO et al. (1993) observaram que durante o amadurecimento de frutos de tomates a expressão da enzima sintase do fitoeno aumenta mais de vinte vezes enquanto que a da fitoeno desaturase aumenta menos do que 3 vezes, indicando portanto uma regulação diferenciada dessas duas enzimas. A fitoeno desaturase, segundo CORONA et al. (1996), é codificada ao nível do DNA nuclear por um único gene *Pds* e sua expressão está intimamente associada à diferenciação dos cromoplastos.

Os cromoplastos de frutos, flores, tubérculos e raízes podem se desenvolver tanto de amiloplasto, que são plastídios incolores que contêm grãos de amido, como de cloroplastos. Em frutos de tomate, a transformação de cloroplasto em cromoplasto foi descrita por HARRIS & SPURR (1969a, b). A primeira mudança é a perda da estrutura de grana e degradação da clorofila, seguida da formação de glóbulos osmiofílicos, que contêm os primeiros pigmentos carotenóides, e seu aumento em número e tamanho. A fase final da formação dos cromoplastos é a formação de cristais alongados de licopeno, que ocupam a maior parte do cromoplasto.

O consumo de carotenóides na dieta humana fornece uma essencial fonte de vitamina A e suas propriedades antioxidantes têm sido apresentadas como de grande importância na prevenção de doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares, e alguns tipos de câncer (MAYNE, 1996). Essas propriedades benéficas dos carotenóides têm levado ao crescente aumento no interesse da manipulação de genes ligados à síntese de carotenóides nas plantas cultivadas. Além disso, a coloração da epiderme dos frutos é um parâmetro de qualidade importante que interfere na aceitação deste produto pelo consumidor.

Os mutantes naturais têm sido utilizados como potenciais doadores de genes em programas de melhoramento que visam obter frutos com melhor conservação pós-colheita. Diversos mutantes têm sido identificados na espécie *Lycopersicon esculentum*, como os mutantes pleiotrópicos *Never ripe (Nr)*, *non-ripening (nor)*, *ripening inhibitor (rin)* e *alcobaça (alc)*, que apresentam frutos com reduzido amolecimento, menor produção de etileno e alterações de cor

menos intensas durante o amadurecimento (TIGCHELAAR et al., 1978; MUTSCHLER et al., 1992).

O mutante 'Firme', originado de uma mutação natural do cv. Santa Clara, apresenta frutos com coloração "amarelo-creme" quando imaturos e vermelha quando maduros, maturação lenta quando ligados à planta mãe e frutos mais firmes que o fenótipo normal (MOURA, 1999; MOURA et al., 2002). SCHUELTER et al. (1998 a, b) demonstraram que apenas um gene recessivo controla esta mutação quanto ao seu efeito sobre as modificações na firmeza do fruto e as alterações na cor. Análises desta mutação revelaram sua importância em programas de melhoramento interpopulacionais visando a obtenção de genótipos com maior potencial de conservação pós-colheita (SCHUELTER et al., 2001). No entanto, ainda não foram determinadas as diferenças entre o mutante e a cultivar normal quanto aos aspectos relacionados com as mudanças na cor durante o amadurecimento dos frutos.

O objetivo do presente trabalho foi comparar os genótipos quanto às alterações visuais da cor, às alterações nos teores de carotenóides e às alterações ultraestruturais no processo de diferenciação dos cromoplastos em frutos de tomate do cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme' durante seu amadurecimento na planta, visando à obtenção de maiores informações sobre essa mutação, que poderão ser utilizadas como base para futuros trabalhos de melhoramento desta espécie.

2.0 - MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de tomateiro cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme' foram colhidos pela manhã na estação experimental da Universidade da Florida (UF), Quincy, Florida, EUA, transportados para o laboratório de fisiologia pós-colheita do Departamento de Horticultura da UF, Gainesville, FL, lavados em água corrente, para retirada de sujidades, e mergulhados em água clorada ($1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ de hipoclorito de sódio) por 1 minuto, para desinfecção da superfície dos frutos. Os frutos foram então selecionados quanto à uniformidade de tamanho, ausência de defeitos e ao estágio de maturidade.

Os frutos foram separados visualmente em 6 estádios de maturidade (FIGURA 1) de acordo com a escala de cor sugerida pelo Departamento de Agricultura dos EUA (USDA, 1976) como se segue:

- estágio 1: aqueles que atingiram seu máximo crescimento e ainda não apresentavam nenhum indício de cor vermelha na epiderme;
- estágio 2: aqueles que apresentavam menos de 10% de cor vermelha;
- estágio 3: aqueles que apresentavam entre 11 e 40% de cor vermelha;
- estágio 4: aqueles que apresentavam entre 41 e 80% de cor vermelha;
- estágio 5: aqueles que apresentavam mais de 80% de cor vermelha, mas ainda não se encontram totalmente vermelhos;
- estágio 6: aqueles que se apresentavam totalmente vermelhos.

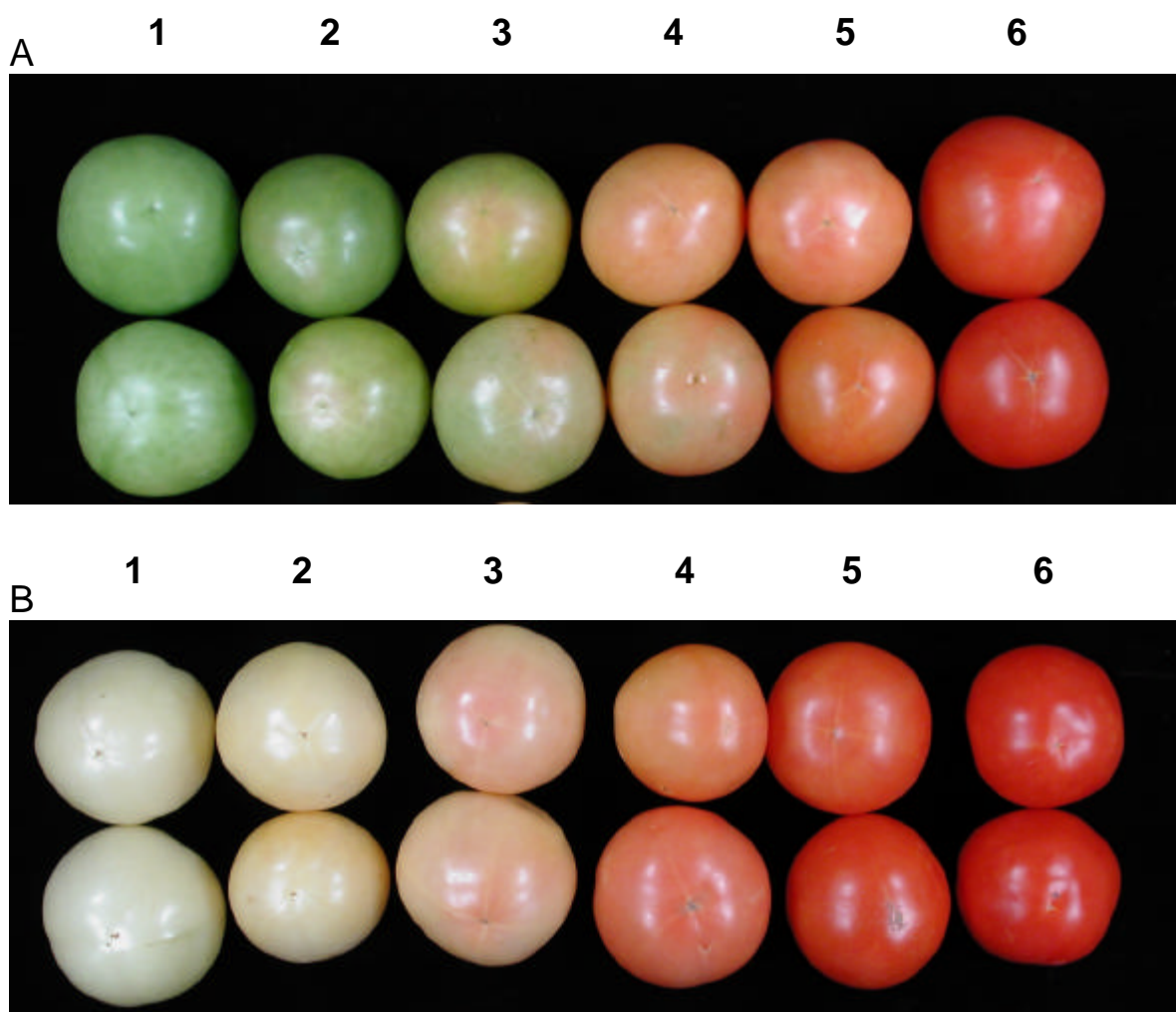


Figura 1. Classificação dos estádios de maturidade de tomates cv. Santa Clara (A), cujo peso médio é de 173,7 g, e seu mutante natural 'Firme' (B), cujo peso médio é de 136,6 g. Da esquerda para direita têm-se: estágio 1 os frutos que atingiram seu máximo de crescimento e ainda não apresentavam nenhum indício de cor vermelha na epiderme; estágio 2 aqueles que apresentavam menos de 10% de cor vermelha; estágio 3 aqueles que apresentavam entre 11 e 40% de cor vermelha; estágio 4 aqueles que apresentavam entre 41 e 80% de cor vermelha; estágio 5 aqueles que apresentavam mais de 80% de cor vermelha, mas ainda não se encontram totalmente vermelhos; estágio 6 aqueles que apresentavam-se totalmente vermelhos.

Para a avaliação da mudança da cor dos frutos, a coloração da epiderme foi determinada fazendo-se duas medidas na região apical do fruto utilizando-se um colorímetro manual (modelo Minolta CR-300, Minolta Corp., Ramsey, NJ, EUA) calibrado com a cor branca. O sistema utilizado para medir a cor foi o 'L' 'a' 'b' de Hunter, onde 'L' refere-se à intensidade da luz (valores maiores: mais escuro), 'a' a cromaticidade em um eixo que varia do verde (valores negativos) ao vermelho (valores positivos), e 'b' a cromaticidade em um eixo que vai do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos) (FRANCIS, 1970). Foram realizados dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado, um para o 'Santa Clara' e outro para o mutante 'Firme', cada um com 6 tratamentos e 4 repetições, contendo um fruto cada. Foi realizada a análise da variância conjunta dos dados (Apêndice). As variáveis, independente de a interação ser significativa ou não, tiveram suas médias comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o estudo da ultraestrutura, visando à diferenciação de cromoplastos, foram feitos cortes anatômicos transversais do pericarpo na região equatorial dos frutos nos estádios 1, 3 e 5. As amostras foram analisadas no laboratório de microscopia eletrônica da UF. As amostras foram fixadas com tampão de fixação de Karnovsky em 0,1 M de cacodilato de sódio e 4% de sacarose. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes com tampão e pós-fixadas por uma hora em tampão de 1% de tetróxido de ósmio. Seguiram-se então três lavagens com água duplamente destilada e a desidratação com uma sequência gradativa de etanol seguida por acetona. As amostras foram então infiltradas em uma série gradual de resina epóxi Epon 812 e curadas por 2 dias a 60°C em 100% da resina. Os cortes foram feitos em

ultramicrotomo Leica Ultracut R e coletados em tela coberta com filme de Butvar 0,4% (polovinil). Posteriormente, os cortes foram corados com acetato de uranila aquoso a 2% e citrato de chumbo. As observações foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão Hitachi H-7000 e as imagens digitais adquiridas via Gatan Bioscan Digital Micrograph 3.1.1.

Para a determinação dos pigmentos contidos no pericarpo dos frutos, tomates do cv. Santa Clara e de seu mutante natural 'Firme' foram colhidos pela manhã na horta da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, transportados para o laboratório de pós-colheita do Departamento de Fitotecnia da UFV, lavados em água corrente, para retirada de sujidades, e mergulhados em água clorada ($1.000 \mu\text{LL}^{-1}$ de hipoclorito de sódio) por 1 minuto, para desinfecção da superfície dos frutos. Os frutos foram então selecionados quanto à uniformidade de tamanho, ausência de defeitos e ao estágio de maturidade. Para cada estágio de maturidade foram selecionados 20 frutos, sendo que estes foram separados aleatoriamente em 4 grupos de 5 frutos cada. Foram considerados dois experimentos com delineamento inteiramente casualizado, um para o cv. Santa Clara e outro para o mutante, cada um com 6 tratamentos e 4 repetições, e feita a análise da variância conjunta das variáveis (Apêndice). As variáveis, independente de a interação ter sido significativa ou não, tiveram suas médias comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A determinação dos pigmentos foi feita de acordo com a metodologia descrita por ZSCHEILE & PORTER (1947). Amostras de 5 g do pericarpo foram retiradas da região equatorial dos frutos e armazenadas a -20°C com 20 mL de acetona. Para as análises, as amostras foram homogeneizadas com 20

mL de hexano em almofariz, filtradas em papel de filtro a vácuo e levadas ao funil de separação, tendo sido lavadas 3 vezes com água destilada. Seguiu-se a lavagem sequencial com 20 mL de metanol 90%, 20 mL de hidróxido de potássio a 20% em metanol e 20 mL de metanol 90%. O funil foi finalmente lavado por 3 vezes com água destilada e a fase em hexano restante foi retirada e seu volume ajustado. A solução remanescente de pigmentos em hexano foi então analisada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 487,5 e 502 nm. As fórmulas utilizadas para a determinação de carotenóides totais e licopeno segundo a Lei de Beer foram:

1- Carotenóides totais (CAR) em g de carotenóides g MF⁻¹

$$\text{CAR} = \frac{\text{ABS } 487,5 \times \text{FD} \times 10^5}{181 \times \text{LC} \times \text{MF}}$$

Onde ABS é a absorbância lida, FD é o fator de diluição, LC é a largura da cubeta em cm e MF o peso da matéria fresca em g.

2- Licopeno (LIC) em % de carotenóides totais

$$\text{LIC} = \frac{[(\text{ABS } 502 \times 181) / \text{ABS } 487,5] - 42}{237} \times 100$$

237

3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Coloração da epiderme

Durante o amadurecimento normal do tomate ocorre a degradação da clorofila, responsável pela cor verde de frutos jovens, e o acúmulo de pigmentos carotenóides, principalmente o licopeno, responsável pela coloração vermelha dos frutos quando maduros. Essa mudança no balanço dos

pigmentos pode ser observada visualmente pela mudança de cor da epiderme, que pode ser medida pelos valores de 'L' e 'a'. Os frutos de tomateiro durante o seu amadurecimento normal na planta apresentam redução nos valores de 'L', indicando escurecimento da epiderme com o amadurecimento, enquanto que os valores de 'a' aumentam, saindo de valores negativos para positivos, indicando mudança da coloração verde para a vermelha.

Pode-se observar no Quadro 1 que os valores de cor 'L' tanto para frutos normais como para os mutantes diminuíram com o avanço do estágio de maturidade do fruto. No entanto, os frutos normais apresentaram mudança mais gradual e menos intensa nos valores de 'L' do que os frutos mutantes, uma vez que os frutos mutantes apresentaram valores mais elevados nos primeiros estádios de maturidade, indicando uma coloração mais clara, do que os frutos normais, e valores menores do que estes quando alcançaram os estádios mais avançados de maturidade, resultando em coloração mais escura da epiderme. MOURA et al. (1999) observaram em tomates do cv. Agriset a redução característica dos valores de 'L' com o amadurecimento dos frutos menos acentuada em frutos armazenados por 7 dias em atmosfera controlada sob baixos níveis de oxigênio, decorrente de uma inibição na produção de licopeno e na degradação da clorofila.

Os valores de 'a' (Quadro 1), por sua vez, mostraram maior intensidade de coloração vermelha nos frutos mutantes quando comparada àquela dos frutos normais nos 3 primeiros estádios de maturidade. Os frutos mutantes apresentaram valores de 'a' maiores do que os normais nos estádios 5 e 6 de maturidade, indicadores da maior intensidade de cor vermelha ao final do amadurecimento dos frutos. Além disso, os dados de cor obtidos mostram que

principalmente os valores de 'a' podem ser utilizados como referência para diferenciar o grau de maturação dos frutos uma vez que foi encontrada diferença significativa entre os estádios de maturidade tanto para frutos normais como mutantes. MOURA et al. (2002) encontraram apenas valores traços de clorofila nos frutos mutantes do cv. Santa Clara, isto explicaria esta maior intensidade de cor vermelha nos primeiros estádios de maturidade dos frutos mutantes uma vez que a ausência de clorofila permite que a cor vermelha do licopeno em formação apareça. Por outro lado, em frutos normais o alto teor de clorofila ainda nos primeiros estádios de maturidade pode mascarar o aparecimento da coloração vermelha.

Quadro 1. Valores médios de 'L' e 'a', referentes à cor da epiderme, de frutos do cv. Santa Clara (SC) e seu mutante natural 'Firme' (MT) nos estádios de maturidade 1 a 6.

| Estádio de maturidade | 'L' | | 'a' | |
|-----------------------|------------|-----------|------------|-----------|
| | SC | MT | SC | MT |
| 1 | 55,95 a B | 65,69 a A | -11,60 e B | -2,26 e A |
| 2 | 52,91 ab B | 60,69 b A | -5,95 d B | 5,62 d A |
| 3 | 51,91 ab B | 55,89 c A | 5,10 c B | 11,63 c A |
| 4 | 48,83 bc A | 50,95 d A | 15,82 b A | 18,85 b A |
| 5 | 46,35 cd A | 46,67 d A | 17,38 b B | 22,44 b A |
| 6 | 42,33 d A | 37,88 e B | 23,46 a B | 27,96 a A |

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.2 - Produção de carotenóides

Segundo FRASER et al. (1994), durante o amadurecimento dos frutos de tomate a quantidade de carotenóides por unidade de matéria fresca aumenta mais de 10 vezes e ocorre alteração dos carotenóides cíclicos, presentes nos cloroplastos, para o composto acíclico licopeno. No Quadro 2 podemos observar que os teores de carotenóides totais e licopeno tiveram aumento significativo de mais de 20 vezes com o amadurecimento na planta, tanto para os frutos do cv. Santa Clara quanto para frutos do mutante 'Firme'. MOURA et al. (2002) observaram aumentos de semelhante magnitude nos teores de carotenóides totais e licopeno em frutos normais e mutantes após o armazenamento de frutos no estádio 1 por 16 dias a $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Nos estádios mais avançados de maturidade foram encontradas diferenças significativas quanto ao teor de licopeno entre os frutos mutantes e os frutos do cv. Santa Clara, que apresentaram valores maiores. Por outro lado, os teores de carotenóides totais não apresentaram diferença significativa entre frutos do cv. Santa Clara e frutos mutantes, apesar dos mutantes apresentarem valores absolutos menores. Segundo MOURA et al. (2002) os frutos mutantes produzem menor quantidade de etileno, principalmente no final do amadurecimento, o que poderia explicar os menores teores de carotenóides totais e licopeno nos frutos mutantes. HAMILTON et al. (1990) observaram que em frutos de plantas de tomate transformadas com o gene em posição antisense para a enzima oxidase do ACC, que catalisa a transformação de ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) em etileno, a produção de etileno durante o amadurecimento foi inibida em aproximadamente 95% e os

frutos maduros apresentavam redução no acúmulo de carotenóides, principalmente licopeno.

Quadro 2. Valores médios de carotenóides totais (g de carotenóides g MF⁻¹) e licopeno (g de licopeno g MF⁻¹) para frutos do cv. Santa Clara (SC) e seu mutante natural 'Firme' (MT) nos estádios de maturidade 1 a 6.

| Estádio de maturidade | Carotenóides totais | | Licopeno | |
|-----------------------|---------------------|------------|------------|------------|
| | SC | MT | SC | MT |
| 1 | 15,74 e A | 8,14 d A | 0,63 d A | 6,47 c A |
| 2 | 37,79 e A | 34,25 d A | 6,53 d A | 6,27 c A |
| 3 | 126,13 d A | 74,44 cd A | 69,36 d A | 27,10 c A |
| 4 | 260,22 c A | 119,33 c B | 157,94 c A | 52,59 c A |
| 5 | 339,00 b A | 212,15 b B | 263,80 b A | 148,16 b B |
| 6 | 426,96 a A | 390,88 a A | 384,72 a A | 323,03 a B |

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.3 - Ultraestrutura

Ao nível da microscopia eletrônica podemos observar em cortes transversais do pericarpo de tomates da cv. Santa Clara no estágio 1 de maturidade que as células se apresentavam altamente vacuoladas com o citoplasma limitado a uma fina camada periférica (Figura 2). Neste estágio, os plastídios apresentaram formas arredondadas e morfologia típica de

cloroplastos como previamente descrita em outros trabalhos (HARRIS & SPURR, 1969; CROOKES & GRIERSON, 1983; CHEUNG et al., 1993); pode-se observar na Figura 3 a presença do estroma, de plastoglóbulos, e de tilacóides, com grana bem desenvolvidos.



Figura 2. Cortes transversais do pericarpo de tomates cv. Santa Clara no estágio 1 de maturidade fixados em tampão de fixação de Karnovsky e pós-fixados com tetróxido de ósmio; célula altamente vacuolada (V), com o citoplasma limitado a uma fina camada periférica; plastídios com formas arredondadas e morfologia típica de cloroplastos (C). X 9.400 (A)

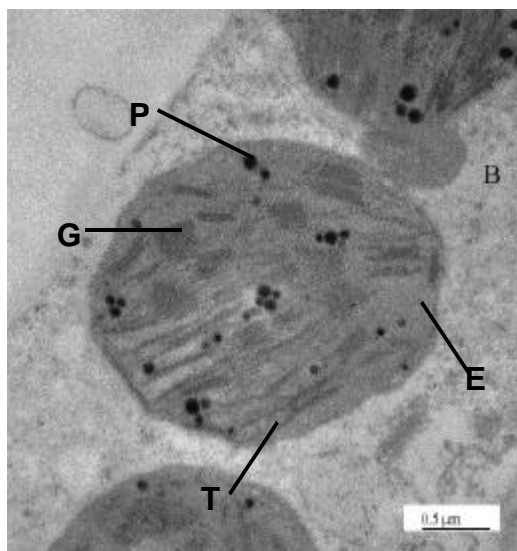


Figura 3. Cortes transversais do pericarpo de tomates cv. Santa Clara no estágio 1 de maturidade fixados em tampão de fixação de Karnovsky e pós-fixados com tetróxido de ósmio; detalhe do cloroplasto, observa-se a presença do estroma (E), de plastoglóbulos (P), e de tilacóides (T), com grana (G) bem desenvolvidos. X 38.200. (B)

Durante o amadurecimento normal dos frutos do cv. Santa Clara a coloração vermelha começa a ser visível na região distal do fruto e se desenvolve gradualmente por toda superfície do fruto, resultado da degradação da clorofila e do acúmulo de carotenóides nos cromoplastos. Nas Figuras 4A, 4B, 4C e 4D podemos observar a seqüência de eventos que culminam na formação de cromoplastos totalmente desenvolvidos presentes no pericarpo de frutos do cv. Santa Clara, inclusive a alteração do formato arredondado do cloroplasto para a forma fusiforme do cromoplasto. Inicialmente, como pode ser observado em cortes do estágio 3 de maturidade, ocorre a desorganização do sistema de grana (Figura 4A), a formação de glóbulos que armazenam

pigmentos (Figura 4B) e o aparecimento de compartimentos que parecem ser derivados do aumento de volume dos tilacóides remanescentes (Figura 4C). Em seguida, com o aumento do acúmulo de pigmentos no interior desses compartimentos são formados cristais de licopeno (Figura 4D), que podem ser observados nos cortes de frutos no estágio 5, que aumentam de número e volume, resultando na formação de cristais múltiplos que ocupam a maior parte do volume do cromoplasto totalmente desenvolvido, que apresenta formato fusiforme (Figura 5).

Nos cortes transversais do pericarpo de tomates mutantes podemos observar que as células do pericarpo de frutos no estágio 1 de maturidade se apresentavam altamente vacuoladas com o citoplasma limitado a uma fina camada periférica da mesma maneira que nos frutos normais (Figura 6). No entanto, não foram encontradas estruturas típicas de cloroplastos; podemos observar na Figura 7 a presença de pro-plastídios de formato arredondado contendo membranas do tilacóide e a presença de plastoglobulos, corpos lipídicos osmiofílicos.

No estágio 3 de maturidade foram encontrados plastídios em estágio de diferenciação em cromoplasto, onde podem ser observados o aumento do volume interno dos tilacóides (Figura 8A) e a formação de glóbulos armazenadores de pigmentos (Figura 8B). A cristalização de pigmentos foi detectada a partir do estágio 5 de maturidade (Figura 8C). A formação de cristais alongados de licopeno altera, portanto, o formato dos pro-plastídios transformando-os em cromoplastos de formato fusiforme (Figura 8D).

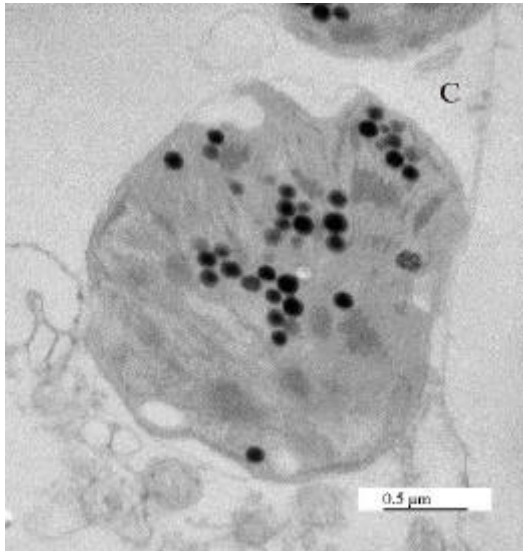


Figura 4A

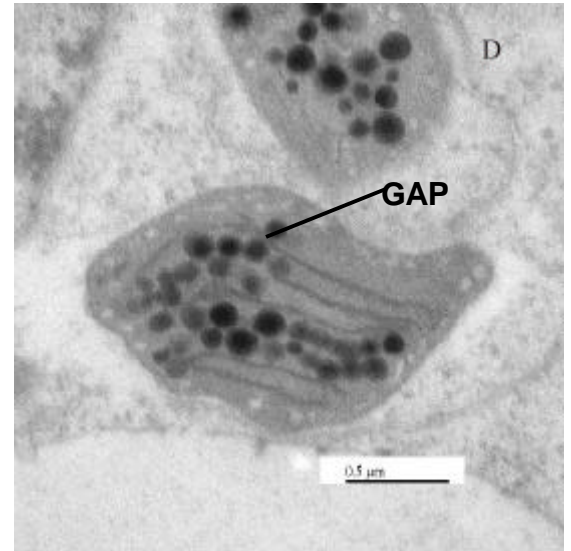


Figura 4B

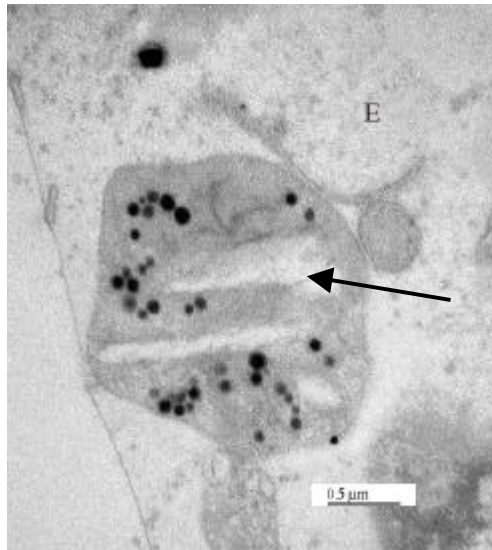


Figura 4C

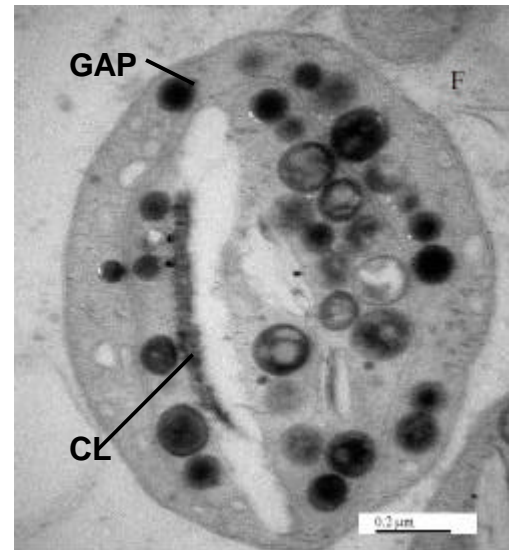


Figura 4D

Figura 4. Diferenciação de cromoplastos durante o amadurecimento de frutos 'Santa Clara'. Cortes transversais do pericarpo de tomates fixados em tampão de fixação de Karnovsky e pós-fixados com tetróxido de ósmio. Figura 4A. Estádio 3 de maturidade; plastídeos em estágio de transição entre cloroplasto e cromoplasto, note-se a desorganização do sistema de grana. X 38.200 (C).

Figura 4B. Estádio 3 de maturidade; plastídeos em estágio de transição entre cloroplasto e cromoplasto, detalhe da formação de glóbulos de armazenamento de pigmentos (GAP). X 57.900 (D). Figura 4C. Estádio 3 de maturidade; plastídeos em estágio de transição entre cloroplasto e cromoplasto, detalhe do aparecimento de compartimentos (seta) derivados do aumento de volume dos tilacóides remanescentes. X 38.200 (E). Figura 4D. Estádio 5 de maturidade; plastídeos em estágio de transição entre cloroplasto e cromoplasto, detalhe dos glóbulos de armazenamento de pigmentos (GAP) e dos cristais de licopeno alongados (CL). X 70.850 (F).

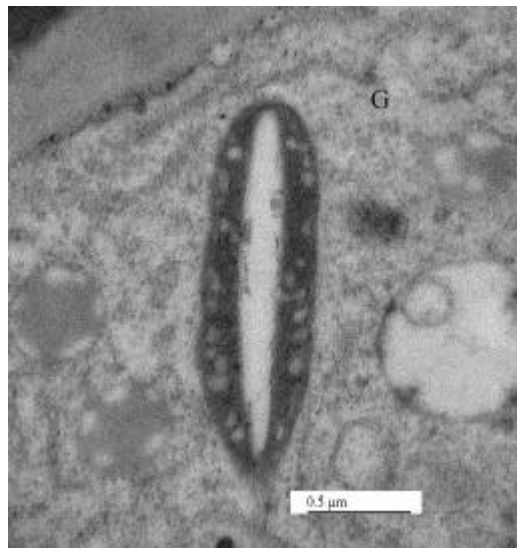


Figura 5. Cortes transversais do pericarpo de tomates cv. Santa Clara no estágio 5 de maturidade fixados em tampão de fixação de Karnovsky e pós-fixados com tetróxido de ósmio; cromoplasto totalmente desenvolvido, cristais múltiplos ocupando a maior parte do volume do cromoplastos, que apresenta formato fusiforme. X 57.900 (G).

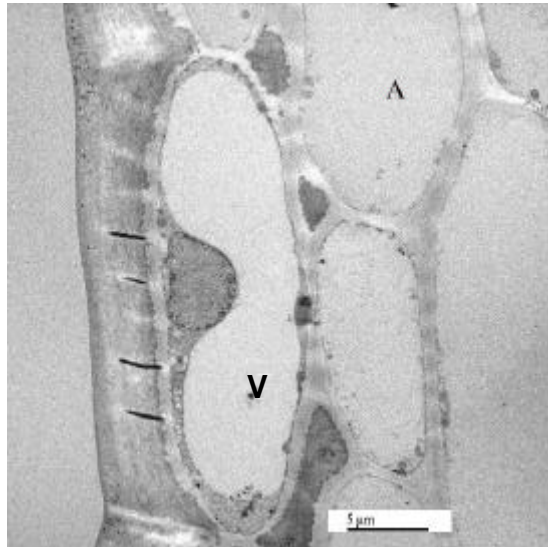


Figura 6. Cortes transversais do pericarpo de tomates mutantes 'Firme' no estágio 1 de maturidade fixados em tampão de fixação de Karnovsky e pós-fixados com tetróxido de ósmio; célula altamente vacuolada (V) com o citoplasma limitado a uma fina camada periférica. X 5.600 (A).

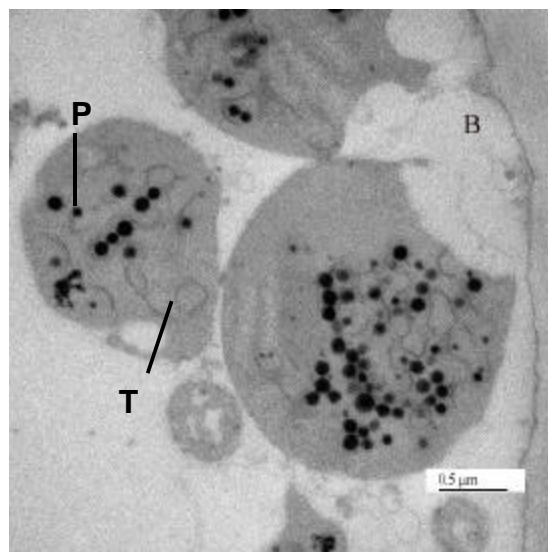


Figura 7. Cortes transversais do pericarpo de tomates mutante 'Firme' no estágio 1 de maturidade fixados em tampão de fixação de Karnovsky e pós-fixados com tetróxido de ósmio; observa-se a presença de pro-plastídios de formato arredondado contendo membranas do tilacóide (T) e plastoglobulos (P). X 38.200 (B).

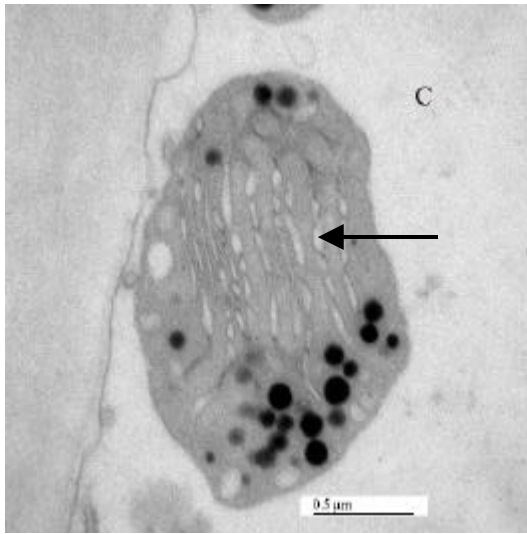


Figura 8A

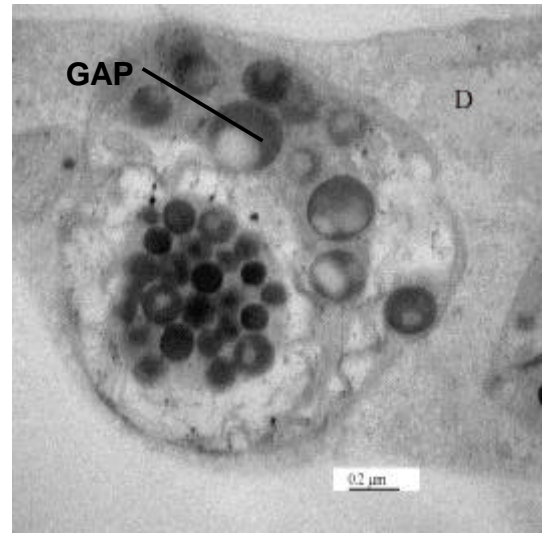


Figura 8B

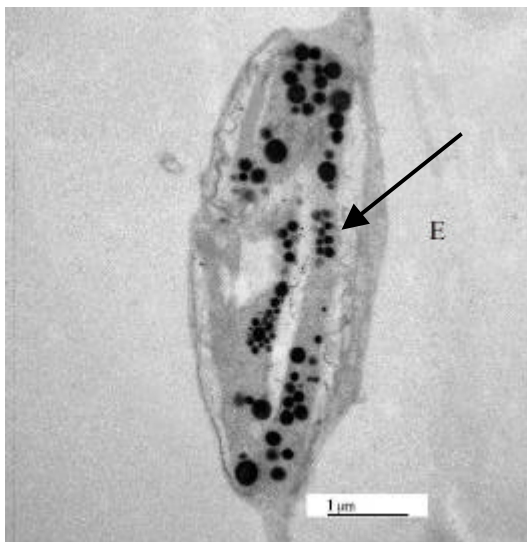


Figura 8C

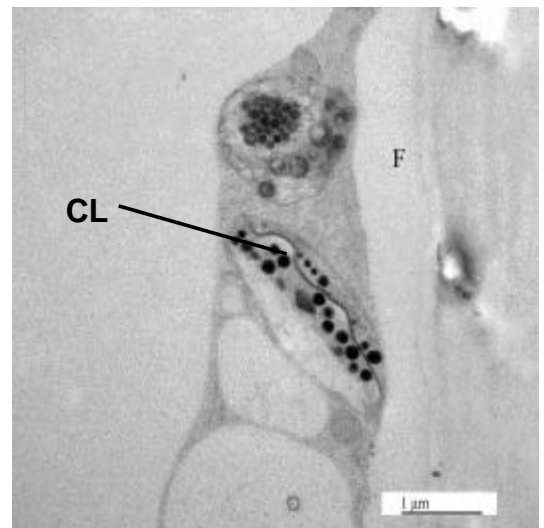


Figura 8D

Figura 8. Diferenciação de cromoplastos durante o amadurecimento de frutos do mutante 'Firme'. Cortes transversais do pericarpo de tomates fixados em tampão de fixação de Karnovsky e pós-fixados com tetróxido de ósmio. Figura 8A. Estádio 3 de maturidade; plastídios em estágio de diferenciação em cromoplasto, detalhe do aumento do volume interno dos tilacóides (seta). X 57.900 (C). Figura 8B. Estádio 3 de maturidade; plastídios em estágio de

diferenciação em cromoplasto, detalhe da formação de glóbulos armazenadores de pigmentos (GAP). X 90.200 (D). Figura 8C. Estádio 5 de maturidade; plastídios em estágio de diferenciação em cromoplasto, detalhe da cristalização de pigmentos (seta). X 28.080 (E). Figura 8D. Estádio 5 de maturidade; cromoplastos totalmente desenvolvido, presença de cristais alongados de licopeno (CL), formato fusiforme. X 28.080 (F).

4.0 - CONCLUSÕES

Os frutos 'Santa Clara' apresentaram mudança de cor da epiderme mais gradual e menos intensa do que os frutos mutantes, que apresentaram maior intensidade de cor vermelha nos últimos estádios de maturidade, apesar de apresentarem teores mais baixos do que de licopeno nestes estádios.

Os frutos tiveram aumentos nos teores de carotenóides totais e licopeno de mais de 20 vezes tanto para frutos normais como para frutos mutantes durante o amadurecimento na planta. Frutos do mutante 'Firme' apresentaram teores de carotenóides, principalmente de licopeno, mais baixos do que os frutos do cv. Santa Clara nos últimos estádios de maturidade devido provavelmente a menor produção de etileno pelos mutantes.

Os estudos de ultraestrutura evidenciaram que durante o amadurecimento de tomates 'Santa Clara' os cloroplastos pré-existentes sofrem diferenciação e se diferenciam em cromoplastos; por outro lado, no mutante 'Firme' a diferenciação em cromoplastos pode ocorrer inteiramente independente da presença de cloroplastos.

5.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTLEY, G.E.; VIITANEN, P.V.; BACOT, K.O.; SCOLNIK, P.A. A tomato gene expresses during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 8, p. 5036-5039, 1992.
- CHEUNG, A.Y.; McNELLIS, T.; PIEKOS, B. Maintenance of chloroplast components during chromoplast differentiation in the tomato mutant green flesh. **Plant Physiology**, v. 101, n. 4, p. 1223-1229, 1993.
- CORONA, V.; ARACRI, B.; KOSTURKOVA, G.; BARLEY, G.E.; PITTO, L.; GIORGETTI, L.; SCOLNIK, P.A.; GIULIANO, G. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. **The Plant Journal**, v. 9, n.4, p. 505-512, 1996.
- CROOKES, P.R. & GRIERSON, D. Ultrastructure of tomato fruit ripening and role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. **Plant Physiology**, v. 72, p. 1088-1093, 1983.
- FRANCIS, F.J. Color measurement in plant breeding. **HortScience**, v. 5, p. 10-14, 1970.
- FRASER, P.D.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P.M. Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts – partial purification and biochemical properties. **Planta**, v. 211, p. 361-369, 2000.
- FRASER, P.D.; TRUESDALE; M.R.; BIRD,C.R.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P.M. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. **Plant Physiology**, v. 105, p. 405-413, 1994.

- GIULIANO, G.; BARTLEY, G.E.; SCOLNIK, P.A. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell*, v. 5, p. 379-387, 1993.
- HAMILTON, A.J.; LYCETT, G.W.; GRIERSON, D. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. **Nature**, v. 346, p. 284-287, 1990.
- HARRIS, W.M. & SPURR, A.R. Chromoplasts of tomato fruits. I. Ultrastructure of low-pigment and high-beta mutants in carotene analyses. **American Journal of Botany**, v. 56, p. 369-379, 1969a.
- HARRIS, W.M. & SPURR, A.R. Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomatoes. **American Journal of Botany**, v. 56, p. 441-444, 1969b.
- KHUDAIRI, A.K. The ripening of tomatoes. A molecular ecological approach to the physiology of fruit ripening. **American Scientist**, v. 60, n. 6, p. 696-707, 1972.
- KRINSKY, N.I. Carotenoid protection against photooxidation. **Pure Applied Chemistry**, v. 51, p. 649-660, 1979.
- MAYNE, S.T. Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. **FASEB Journal**, v. 10, p. 690-701, 1996.
- MOURA, M.A. **Crescimento e pós-colheita de frutos do tomateiro cv. Santa Clara e do seu mutante firme**. Viçosa: UFV, 1999. 86 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- MOURA, M.L; SARGENT, S.A.; OLIVEIRA, R.F. de. Efeito da atmosfera controlada na conservação de tomates colhidos em estágio intermediário de maturidade. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 1, p. 135-142, 1999.

- MOURA, M.L.; MOURA, M.A.; PINTO, C.M.F.; FINGER, L.F. Amadurecimento de frutos de tomateiro cv. Santa Clara e de seu mutante natural 'Firme'. **Revista Brasileira de Armazenamento**, 2002. (no prelo)
- MUTSCCHLER, M.A.; WOLFE, D.W.; COBB, E.D.; YOURSTONE, K.S. Tomato fruit quality and shelf life in hybrids heterozygous for the *alc* ripening mutant. **HortScience**, v. 27, n. 4, p. 352-355, 1992.
- SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; FINGER, F.L.; CRUZ, C.D.; COELHO, A.D.F. Analysis of mendelian segregation in a natural occurred tomato mutant. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 217, 1998a.
- SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; FINGER, F.L.; SPRITZE, A.L. Herança de um mutante de tomate que condiciona modificações em características morfológicas e fisiológicas. **Horticultura Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 96. 1998 b.
- SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; CRUZ, C.D.; FINGER, F.L.; AMARAL JÚNIOR, A.T. do; SHIMOYA, A. Biometrical analysis of a mutant that increases shelf-life of tomato fruits. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, n.1, p. 44-53, 2001.
- TIGCHELAAR, E.C.; McGLASSON, W.B.; BUESCHER, R.W. Genetic regulation of tomato fruit ripening. **HortScience**, v. 13, p. 508-513, 1978.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **United States standards for grades of fresh tomatoes**. Washington DC, United States Department of Agriculture, 11pg. 1976.

VISHNEVETSKY, M.; OVADIS, M.; VAINSTEIN, A. Carotenoid sequestration in plants: role of carotenoid-associated proteins. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 6, p. 232-235, 1999.

ZSCHEILE, F.P. & PORTER, J.W. Analytical methods for carotenes of lycopersicon species and strains. **Analytical Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 47-52, 1947.

APÊNDICE

Quadro 1. Resumo da análise de variância conjunta das variáveis carotenóides totais (CAR), licopeno (LIC), cor 'L' (L) e cor 'a' (a) em função de variedades (V) e estágio de maturidade (EST).

| F.V. | G.L. | QUADRADOS MÉDIOS | | | |
|---------|------|------------------|-------------|----------|-----------|
| | | CAR | LIC | L | a |
| V | 1 | 44806,09** | 33995,08** | 126,67** | 534,27** |
| EST | 5 | 186258,60** | 150274,90** | 444,65** | 1261,14** |
| V*EST | 5 | 7031,92** | 5239,50** | 52,94** | 20,70** |
| RESÍDUO | 36 | 1355,58 | 1192,45 | 4,22 | 4,77 |
| CV (%) | | 21,60 | 28,65 | 4,00 | 20,41 |

* F significativo ao nível de 1% de probabilidade

ARTIGO 2

**MUDANÇAS FISIOLÓGICAS DURANTE O AMADURECIMENTO NA
PLANTA DE FRUTOS DE TOMATEIROS ‘SANTA CLARA’ E MUTANTE
‘FIRME’**

RESUMO

As mutações espontâneas na espécie *Lycopersicon esculentum* têm sido muito utilizadas pelos melhoristas como fonte de variabilidade genética com o objetivo de produzir tomates que apresentam maior resistência ao manuseio pós-colheita. Na região produtora de hortaliças de Viçosa, MG, identificaram-se plantas de tomate da cultivar Santa Clara cujos frutos apresentam coloração “amarelo-creme” quando imaturos e diversos aspectos de seu amadurecimento alterados. O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações fisiológicas que ocorrem durante o processo de amadurecimento na planta de frutos de tomate do cv. Santa Clara e seu mutante natural ‘Firme’. Os frutos normais e mutantes foram colhidos em 6 diferentes estádios de maturidade, e em cada um deles foram avaliados a produção de etileno e CO₂, os teores de açúcares solúveis totais no pericarpo e no tecido locular, e as atividades das enzimas oxidase do ACC e poligalacturonase. Os frutos mutantes apresentaram menor taxa respiratória e menor produção de etileno em todos os estádios de maturidade. A atividade da oxidase do ACC apresentou padrão de comportamento distinto durante o amadurecimento na planta de frutos mutantes e normais, estes, no entanto, apresentaram mesma magnitude de atividade. Frutos mutantes apresentaram atraso no aumento da atividade da enzima poligalacturonase em relação aos frutos normais. Os frutos

normais acumularam açúcares durante seu amadurecimento na planta, enquanto que frutos mutantes apresentaram teores menores em estádios mais avançados de maturidade quando comparados com frutos no início do amadurecimento, sendo que frutos mutantes apresentaram teores de açúcares totais menores do que os de tomates normais tanto no pericarpo quanto no tecido locular.

ABSTRACT

Breeders have been using natural mutants of *Lycopersicon esculentum* species as source of genetic variability to enhance tomato fruit postharvest life. 'Santa Clara' tomato plants showing pale-yellow fruits and others fruit ripening aspects changed were found in Viçosa, MG. The aim of this work was to study the physiological changes during ripening of attached 'Santa Clara' tomato fruit and its natural mutant 'Firme'. Ethylene and CO₂ production, locular tissue and pericarp total soluble sugars content, and ACC oxidase and poligalacturonase activity were evaluated in wild type and mutant fruits harvested at 6 maturity stages. Mutant fruit showed lower ethylene and CO₂ production at all maturity stages. ACC oxidase activity showed a distinct pattern during ripening of attached wild type and mutant fruits, nevertheless, the amount found for mutant and wild type were practically the same. Mutant fruit showed a delay on poligalacturonase activity rise comparing to wild type fruit. While wild type fruit showed a rise on total soluble sugars content during ripening mutant fruit showed a decrease on it, nevertheless, mutant fruit showed lower levels than

wild type fruit for locular and pericarp total soluble sugars content at all maturity stages.

1.0 - INTRODUÇÃO

O tomate é uma das olerícolas mais consumidas no Brasil e no exterior e, por ser um produto perecível, muitos são os problemas que ocorrem entre a colheita e a chegada deste produto ao consumidor. Muitos têm sido os esforços para tentar reduzir as perdas pós-colheita, como, por exemplo, o armazenamento refrigerado associado, ou não, à atmosfera controlada. No entanto, o tomate é sensível à injúria pelo frio, o que dificulta a utilização de baixas temperaturas por períodos prolongados.

Atualmente, a manipulação da variabilidade genética por meio de mutações, recombinações genéticas e transformações via técnica de DNA recombinante tem sido uma importante ferramenta para obtenção de frutos mais resistentes ao manuseio pós-colheita. As mutações espontâneas apresentam-se como uma das maiores fontes de variabilidade genética para os programas de melhoramento. Diversos mutantes têm sido identificados na espécie *L. esculentum*, que apresentam diversos aspectos do amadurecimento dos frutos alterado. Os mutantes pleiotrópicos *Never ripe (Nr)*, *non-ripening (nor)*, *ripening inhibitor (rin)* e *alcobaça (alc)*, por exemplo, apresentam frutos com reduzido amolecimento, menor produção de etileno e alterações de cor menos intensas durante o amadurecimento.

Na região produtora de hortaliças de Viçosa, MG, identificaram-se plantas de tomate da cultivar Santa Clara cujos frutos apresentam coloração

“amarelo-creme” quando imaturos, maturação lenta quando ligados à planta mãe e frutos mais firmes quando maduros (MOURA, 1999; MOURA et al., 2002). Trata-se de uma mutação estável, visto que a multiplicação por várias gerações apresenta 100% de frutos semelhantes aos progenitores originais. SCHUELTER et al. (1998a, b) demonstraram que apenas um gene recessivo controla esta mutação, quanto ao seu efeito sobre as modificações na firmeza do fruto e as alterações na cor. Testes de alelismo e mapeamento com marcadores morfológicos e moleculares RAPD indicaram que o gene que controla o fenótipo mutante localiza-se no braço longo do cromossomo 10, na região do gene *lutescent-2* (SCHUELTER, 1999). Análises desta mutação revelaram sua importância em programas de melhoramento interpopulacionais visando a obtenção de genótipos com maior potencial de conservação pós-colheita (SCHUELTER et al., 2001). Deste modo, o estudo das modificações fisiológicas decorrentes do amadurecimento na planta de tomates cv. Santa Clara e seu mutante natural ‘Firme’ pode vir a fornecer novas informações que futuramente poderão ser utilizadas no melhoramento desta espécie, visando frutos mais resistente ao manuseio pós-colheita.

O amadurecimento pode ser caracterizado pelas mudanças na cor, na estrutura da parede celular, no metabolismo de carboidratos e no acúmulo de compostos voláteis dos frutos. Um dos primeiros sinais do amadurecimento é o aumento na taxa de produção de etileno associado ao aumento climatérico da respiração. Não há dúvidas de que o etileno tem uma importância primordial no controle e coordenação do amadurecimento em frutos climatéricos, como é o caso do tomate. O papel do etileno na regulação do amadurecimento do tomate tem recebido atenção especial dos pesquisadores, não apenas pelo

interesse científico, mas também pela conveniência experimental e importância da cultura do tomate no mundo.

O etileno tem um importante papel na iniciação e no prosseguimento do amadurecimento do tomate, e sua biossíntese é regulada pela atividade de duas enzimas específicas, a sintase do ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) e a oxidase do ACC (KLEE et al., 1991). Alguns estudos mostraram que a oxidase do ACC é uma enzima constitutiva, sendo assim, a sintase do ACC poderia ser considerada como passo limitante na biossíntese de etileno. No entanto, SMITH et al. (1986) observaram aumento da indução do mRNA da oxidase do ACC no início do amadurecimento dos frutos de tomate e um rápido acúmulo de mRNA da oxidase do ACC em tecidos injuriados, mostrando a importância desta enzima na regulação da síntese de etileno durante o amadurecimento de tomates. Além disso, estudos realizados recentemente com tomates transgênicos, com gene antisense para a enzima sintase do ACC, sugerem que o acúmulo de mRNA de poligalacturonase (PG), principal enzima responsável pelo processo de perda de firmeza de frutos, é regulada pela presença de etileno (SITRIT & BENNETT, 1998).

A perda de firmeza é um processo que acompanha o amadurecimento de muitos frutos, inclusive o tomate, e é resultado de mudanças estruturais que ocorrem na parede celular. A parede celular é formada por 90 a 95% de carboidratos, entre eles a celulose, a hemicelulose e a pectina, e 5 a 10% de proteínas. A associação das mudanças na estrutura da pectina com o amadurecimento vem sendo extensivamente documentada (LABAVITCH, 1981; HUBER, 1983; HUBER & O'DONOGHUE, 1993). Essas mudanças envolvem a ação de enzimas pectolíticas como a PG, que é a principal

responsável pela perda de firmeza associada ao amadurecimento de frutos, e a pectinametilesterase (PME), que determina a extensão em que a pectina está disponível à degradação pela PG. Além disso, a ação da PG na quebra das pectinas da parede celular é influenciada pelo pH e pelas condições iônicas do meio no local de atuação da enzima (CHUN & HUBER, 1998).

As mudanças que ocorrem na composição do tomate durante a maturação e o amadurecimento já foram extensivamente estudadas. Entre as substâncias orgânicas do tomate, os açúcares e ácidos orgânicos são os constituintes mais importantes para o desenvolvimento do sabor do fruto, e afetam diretamente a qualidade do produto. Uma vez que nas variedades comerciais de tomate os açúcares constituem 1,5 a 4,5% do peso fresco, isto é, cerca de 65% dos sólidos solúveis totais, eles têm grande importância no sabor do fruto maduro (HOBSON & DAVIES, 1971). Os açúcares presentes em frutos maduros são principalmente os redutores, frutose e glicose; estes aumentam progressivamente durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto, enquanto que a acidez aumenta durante o desenvolvimento e alcança um máximo no estágio 2 de maturidade, e então diminui com o amadurecimento (WINSOR et al., 1962; DALAL et al., 1966).

O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações fisiológicas que ocorrem durante o processo de amadurecimento na planta de frutos de tomate do cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme', visando a obtenção de maiores informações sobre essa mutação, que poderão ser utilizadas como base para futuros trabalhos de melhoramento da espécie cultivada.

2.0 - MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de tomateiro do cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme' foram colhidos pela manhã na estação experimental da Universidade da Florida (UF), Quincy, Florida, EUA, transportados para o laboratório de fisiologia pós-colheita do Departamento de Horticultura da UF, Gainesville, FL, lavados em água corrente, para retirada de sujidades, e mergulhados em água clorada ($1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ de hipoclorito de sódio) por 1 minuto, para desinfecção da superfície dos frutos. Os frutos foram então selecionados quanto à uniformidade de tamanho, ausência de defeitos e ao estágio de maturidade.

Para a seleção dos 6 estádios de maturidade avaliados, os frutos foram separados visualmente de acordo com a escala de cor sugerida pelo USDA (1976) como se segue:

- estágio 1 aqueles que atingiram seu máximo de crescimento e ainda não apresentavam nenhum indício de cor vermelha na epiderme;
- estágio 2 aqueles que apresentavam menos de 10% de cor vermelha;
- estágio 3 aqueles que apresentavam entre 11 e 40% de cor vermelha;
- estágio 4 aqueles que apresentavam entre 41 e 80% de cor vermelha;
- estágio 5 aqueles que apresentavam mais de 80% de cor vermelha, mas ainda não se encontram totalmente vermelhos;
- estágio 6 aqueles que se apresentavam totalmente vermelhos.

Foram selecionados 4 frutos de cada estágio de maturidade para a determinação da produção de etileno e da taxa respiratória. A produção de etileno e a taxa respiratória foram medidas à temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, retirando-

se amostras de 0,5 mL e 1 mL, respectivamente, do espaço livre de frascos herméticos de volume igual a 0,465 L, onde os frutos foram acondicionados individualmente, num total de 3 frutos por estágio de maturidade. Para a determinação da produção de etileno, as amostras de gás foram analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se um cromatógrafo equipado com um detector de ionização de chama (modelo 5890, série II, Hewlett Packard, Avondale, PA, EUA) com uma coluna alumina de 60/80 mesh. Para a determinação da taxa respiratória, mediou-se o CO₂ produzido durante o amadurecimento através da cromatografia gasosa utilizando-se um cromatógrafo equipado com um detector de condutividade térmica (série 580, Gow Mac, Leigh Valey, PA, EUA) com uma coluna Poropak Q de 80/100 mesh.

Para efeito de análise estatística foram considerados dois experimentos no delineamento inteiramente casualizado, um para a cv. Santa Clara e outro para o Mutante, cada um com 6 tratamentos e 3 repetições, e feita a análise da variância conjunta das variáveis (Apêndice). As variáveis, independente de a interação ser significativa ou não, tiveram suas médias comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a determinação dos teores de açúcares solúveis totais e das atividades das enzimas, frutos de tomateiro 'Santa Clara' e seu mutante natural 'Firme' foram colhidos no período da manhã na horta da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, e transportados para o laboratório de pós-colheita do Departamento de Fitotecnia onde foram lavados em água corrente, para retirada de sujidades, e mergulhados em água clorada (1.000 µL⁻¹ de hipoclorito de sódio) por 1 minuto, para desinfecção da superfície dos frutos.

Os frutos foram então selecionados quanto a uniformidade de tamanho, ausência de defeitos e ao estágio de maturidade.

Para cada estágio de maturidade foram selecionados 20 frutos, sendo que estes foram separados aleatoriamente em 4 grupos de 5 frutos cada, caracterizando 4 repetições. Foram considerados, assim, dois experimentos com delineamento inteiramente casualizado, um para a cv. Santa Clara e outro para o mutante, cada um com 6 tratamentos e 4 repetições, e feita a análise da variância conjunta das variáveis (Apêndice). As variáveis, independente de a interação ser significativa ou não, tiveram suas médias comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em cada repetição foram determinados os teores de açúcares solúveis totais em amostras do pericarpo e do tecido locular, e as atividades das enzimas oxidase do ACC e poligalacturonase em amostras do pericarpo dos frutos. Na determinação dos teores de açúcares solúveis totais foram adicionadas a 10 g de material vegetal etanol 80% quente e, depois de resfriados, os frascos foram acondicionados em freezer a -20°C . Para a determinação da atividade enzimática o material vegetal foi congelado com nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -20°C .

Para a determinação dos açúcares solúveis totais foi realizada a extração exaustiva com etanol 80% a quente de 5 g de material vegetal. A determinação de açúcares totais foi feita pelo método quantitativo descrito por DUBOIS et al. (1956), pela adição de fenol a 5% e ácido sulfúrico concentrado e leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

A atividade da oxidase do ACC foi realizada seguindo metodologia descrita por FERNANDEZ-MACULET & YANG (1992) e modificada por BARRY

et al. (1996) pela homogeneização de 0,25 g de material vegetal com nitrogênio líquido em almofariz e em seguida adicionada a 1 mL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% (v/v) de glicerol, 5% (p/v) de PVP insolúvel, 30 mM ascorbato de sódio, 0,1 mM FeSO₄, 5 mM DTT), a 4 °C. O macerado foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado imediatamente para a determinação da atividade. A atividade da enzima foi determinada pela incubação do extrato enzimático com solução tampão contendo ACC (100 mM Trisma a pH 7,5 ajustado com HCl, 10% (v/v) de glicerol, 30 mM ascorbato de sódio, 0,1 mM FeSO₄, 30 mM NaHCO₃, 1 mM ACC) por 20 minutos a 30 °C em frasco hermeticamente fechado de 7,5 mL. A produção de etileno na reação foi determinada através de cromatografia gasosa utilizando-se um cromatógrafo a gás, modelo Shimadzu GC-14B, equipado com uma coluna empacotada Porapak-Q de 1,60 m de comprimento, e detector de ionização de chama. A proteína total no extrato enzimático foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) utilizando BSA como padrão.

Na determinação da poligalacturonase seguiu-se a metodologia descrita por HUBER & O'DONOGHUE (1993) homogeneizando-se 5 g de material vegetal com 25 mL de etanol 95%, a 4 °C. O macerado foi centrifugado a 17.000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pelet solubilizado com etanol 80% e novamente centrifugado. O sobrenadante foi novamente descartado e o pelet resuspenso em 10 mL de tampão de extração (50 mM Trisma, 1,2 M NaCl a pH 7,0 ajustado com HCl) em gelo por 30 minutos. O extrato foi centrifugado, filtrado em 4 camadas de gaze e o sobrenadante guardado em gelo. A atividade da enzima foi determinada pela incubação do extrato com solução de ácido poligalacturônico em tampão 100

mM NaOAc a pH 4,5 por 60 minutos a 30 °C. A reação foi paralisada pela adição do reagente nº 1 de Nelson e fervura dos tubos de ensaio por 20 minutos. A produção de ácido galacturônico na reação foi determinada pelo método de SOMOGY-NELSON (HODGE & HOFREITER, 1962) e a proteína total determinada pelo método de BRADFORD (1976) utilizando BSA como padrão.

3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados obtidos e apresentados no Quadro 1, a taxa respiratória e a produção de etileno em frutos do cv. Santa Clara foram significativamente maiores do que em frutos do mutante 'Firme' em todos os estádios de maturidade estudados. A produção máxima de CO₂ da cv. Santa Clara ocorreu no estágio 1 de maturidade para os frutos mutantes, no entanto, não foi possível determinar com exatidão o ponto máximo do climatério respiratório entre os estádios de maturidade estudados. Estes resultados estão de acordo com MOURA (1999) que observou que em frutos mutantes o máximo da produção de CO₂ ocorre em uma fase de seu desenvolvimento anterior ao estágio 1 de maturidade, enquanto que em frutos Santa Clara a produção máxima coincide com o estágio 1 de maturidade.

Quadro 1. Valores médios da taxa respiratória ($\text{mgCO}_2 \text{ h}^{-1}\text{kg}^{-1}$) e da produção de etileno ($\text{LC}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}\text{kg}^{-1}$) em frutos da variedade Santa Clara (SC) e seu mutante natural 'Firme' (MT) nos estádios de maturidade 1 a 6.

| Estádio de maturidade | Taxa respiratória ($\text{mg CO}_2 \text{ h}^{-1}\text{kg}^{-1}$) | | Produção de etileno ($\text{LC}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}\text{kg}^{-1}$) | |
|-----------------------|---|------------|--|-----------|
| | SC | MT | SC | MT |
| 1 | 53,19 a A | 29,14 c B | 5,07 e A | 0,95 e B |
| 2 | 41,79 c A | 31,44 ab B | 8,66 d A | 3,73 d B |
| 3 | 45,33 b A | 31,03 b B | 13,71 c A | 8,16 c B |
| 4 | 34,41 e A | 33,12 a B | 13,45 c A | 10,66 b B |
| 5 | 39,24 d A | 32,27 ab B | 16,36 a A | 13,84 a B |
| 6 | 27,40 f A | 23,65 d B | 15,21 b A | 8,16 c B |

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O etileno tem importante papel na iniciação e no prosseguimento do amadurecimento em todos os frutos climatéricos, como é o caso do tomate. Os dados apresentados no Quadro 1 mostram que em frutos com mais de 80% de coloração vermelha, isto é, no estágio 5 de maturidade, a produção de etileno de frutos mutantes aumentou mais de 10 vezes quando comparada à produção do estágio 1, enquanto que em frutos normais o aumento foi de apenas 3 vezes. No entanto, a produção máxima de etileno, tanto para os frutos de Santa Clara quanto para o Mutante, foi encontrada no estágio 5 de maturidade. Segundo MOURA (1999), a produção de etileno durante o amadurecimento dos frutos mutantes ligados à planta mãe é menor do que a dos frutos Santa Clara; e a ascensão da produção de etileno ocorre antes de completar o

crescimento máximo do fruto no cv. Santa Clara, enquanto que nos frutos mutantes o início da produção de etileno coincide com o máximo crescimento do fruto, isto é, com o estágio 1 de maturidade. No entanto, os autores observaram que para ambas as cultivares a produção máxima de etileno coincide com o final da fase de amadurecimento. HOBSON & GRIERSON (1993) afirmam que não existe um valor crítico interno de etileno que deva ser atingido para que ocorra a indução do amadurecimento do tomate, no entanto, uma mudança interna nos níveis de etileno parece ser necessária para o início do amadurecimento, provavelmente complementada por uma mudança na sensibilidade do tecido ao etileno.

Segundo TERAÍ & MIZUNO (1985) a atividade da oxidase do ACC, que é a enzima responsável pela transformação de ACC em etileno, aumenta durante o amadurecimento de frutos de tomate. No Quadro 2 podemos observar os valores médios da atividade da enzima oxidase do ACC para frutos Santa Clara e mutantes nos 6 diferentes estágios de maturidade. Nos estágios 1 e 2 não há diferença estatística entre os frutos da cv. Santa Clara e o mutante, no entanto, a partir do estágio 3 foram encontradas diferenças significativas entre os frutos da cv. Santa Clara e seu mutante. Os frutos do cv. Santa Clara durante seu amadurecimento ligado à planta mãe apresentam um aumento da atividade da oxidase do ACC até o estágio 4, e depois há uma redução da atividade, enquanto que os frutos mutantes apresentam um aumento progressivo na atividade da oxidase do ACC durante o amadurecimento, apresentando atividade máxima no estágio 6 de maturidade. No entanto, quanto à magnitude da atividade da oxidase do ACC não há

diferença entre os frutos 'Santa Clara' e 'Firme', uma vez que ambos alcançaram valores máximos semelhantes para atividade desta enzima.

Quadro 2. Valores médios da atividade da enzima oxidase do ACC (nL de C₂H₄h⁻¹mg de proteína⁻¹) e da atividade da enzima poligalacturonase (g de ácido galacturônico h⁻¹mg de proteína⁻¹) para a variedade Santa Clara (SC) e o seu mutante natural 'Firme' (MT) nos estádios de maturidade 1 a 6.

| Estádio de maturidade | Atividade da oxidase do ACC (nL de C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg de proteína ⁻¹) | | Atividade da poligalacturonase (g de ác. galacturônico h ⁻¹ mg de proteína ⁻¹) | |
|-----------------------|---|-------------|--|-----------|
| | SC | MT | SC | MT |
| 1 | 69,36 d A | 50,48 d A | 0,40 c A | 0,13 c A |
| 2 | 98,30 cd A | 106,14 c A | 0,81 c A | 0,12 c A |
| 3 | 166,83 ab A | 117,98 bc B | 3,20 b A | 0,54 c A |
| 4 | 189,18 a A | 156,67 ab B | 6,10 b A | 5,54 b A |
| 5 | 130,42 bc B | 178,16 a A | 17,83 a A | 17,33 a A |
| 6 | 119,19 c B | 190,25 a A | 18,81 a A | 22,00 a A |

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Portanto, a menor produção de etileno nos frutos mutantes não parece estar relacionada com a atividade da oxidase do ACC, ou seja, na capacidade do tecido em transformar ACC em etileno. Diante desta observação, podemos inferir que a menor quantidade de etileno produzida pelo mutante se deve, possivelmente, à menor quantidade de ACC, que pode estar relacionada a uma menor atividade da enzima sintase do ACC ou à intensificação da rota de transformação do ACC em *n*-malonil ACC, pela ação da enzima malonil

transferase, com subsequente redução dos níveis de ACC para a oxidase do ACC e redução da produção de etileno. A expressão da atividade da enzima maloniltransferase em frutos de tomate no pré-climatério é intensamente promovida pela aplicação de etileno (SU et al., 1985), promovendo desta forma um mecanismo autoregulatório que limita a produção de etileno.

Segundo SITRIT & BENNETT (1998), o etileno tem um importante papel na regulação da enzima poligalacturonase (PG), considerada a enzima mais importante no processo de perda de firmeza de tomates. MOURA et al (2002) e SCHUELTER (1999) observaram que os frutos do mutante firme apresentavam maior firmeza do que os frutos de plantas da cv. Santa Clara. Desta forma, a menor produção de etileno pelos frutos mutantes poderia estar influenciando a regulação da expressão da enzima PG que, conseqüentemente, estaria afetando a firmeza dos frutos mutantes. No presente trabalho foi avaliada a atividade da PG nos frutos mutantes e Santa Clara nos diversos estádios de maturidade estudados (Quadro 2). Segundo os dados obtidos, não houve diferença significativa na atividade da PG entre os frutos dos genótipos estudados em nenhum dos estádios de maturidade do fruto avaliados.

Em frutos normais a atividade da PG dobra do estágio 1 para o 2, mas é muito pequena, menor do que 1 µg de ácido galacturônico por hora por µg de proteína, e aumenta cerca de 4 vezes quando comparamos frutos no estágio 2 e 3, indicando assim que o estágio 3 é o estágio de aumento de atividade mais intenso em frutos normais. Por outro lado, os frutos mutantes apresentam atividade da PG abaixo de 1 µg de ácido galacturônico por hora por µg de proteína até o estágio 3, sendo que no estágio 4 os frutos apresentam atividade 10 vezes maior do que no estágio 3. Segundo MONTGOMERY et al.

(1993), o gene da PG em tomates não é ativado pelo aumento na produção de etileno relacionado ao início do amadurecimento, mas sim pelo efeito regulatório positivo e negativo de outros elementos durante o amadurecimento, isso poderia explicar a baixa atividade da enzima nos primeiros estádios de maturidade. O aumento da atividade da PG, segundo SAWAMURA et al. (1978), não está envolvido com os primeiros eventos que levam ao início do amadurecimento. No entanto, SITRIT & BENNETT (1998) utilizaram plantas transformadas com antisenso para a sintase do ACC, que apresentavam frutos cuja produção de etileno endógena fora suprimida, e observaram que a aplicação de baixos níveis de etileno em frutos de plantas transformadas era suficiente para que ocorresse o acúmulo de mRNA da PG, o aumento da atividade da enzima e da quantidade de proteína. Portanto, a maior firmeza de frutos mutantes pode estar relacionada com o atraso no aumento da atividade da PG observadas nos frutos do mutante 'Firme'. Tanto para frutos da cv. Santa Clara quanto para os frutos do mutante 'Firme' não houve diferença significativa na atividade da PG entre os estádios 5 e 6 de maturidade (Quadro 2); o atraso no aumento da atividade da PG pode ter comprometido a firmeza final dos frutos independente da atividade da enzima no final do amadurecimento e, conseqüentemente, os frutos mutantes permanecem mais firmes que os normais mesmo quando totalmente maduros.

Outro fator importante para a atividade da PG é a condição do ambiente apoplástico do pericarpo dos frutos. Segundo ALMEIDA e HUBER (1999), durante o amadurecimento de tomates o pH diminui e os níveis de alguns íons aumentam, principalmente o K^+ , no apoplasto, podendo interferir diretamente na atividade das enzimas responsáveis pela degradação da parede celular. Em

frutos no estágio de maturidade 1 o apoplasto apresenta pH de 6,7 e 13 mM de K^+ , enquanto que frutos totalmente maduros apresentam pH de 4,4 e 37 mM de K^+ . A máxima atividade da PG observada experimentalmente pode ser medida em condições de pH de 4,5 e 100 mM de K^+ , segundo CHUN e HUBER (1998). Segundo MOURA et al. (2002), os frutos mutantes apresentam menor extravasamento de eletrólitos durante o amadurecimento quando comparados com frutos normais. Deste modo, mesmo que as condições de pH necessárias tenham sido atingidas para que ocorra aumento da atividade da PG em frutos mutantes no estágio 3 de maturidade, as condições iônicas no apoplasto, isto é, o nível de K^+ , pode estar sendo o fator limitante, provocando o atraso no aumento da atividade da PG no pericarpo de frutos mutantes, uma vez que a condutividade da membrana, apesar de aumentar com o amadurecimento, é menor nestes frutos em relação aos normais.

Outra característica importante na qualidade que está diretamente relacionada ao sabor do tomate e deve ser considerada no melhoramento do tomate é o teor de açúcares. O teor de açúcares solúveis totais no pericarpo em frutos 'Santa Clara' aumenta com o estágio de maturidade enquanto que em frutos mutantes o teor diminui (Quadro 3). Por outro lado, o teor de açúcares totais no tecido locular apresenta um valor máximo no estágio 5 em frutos normais enquanto que em frutos mutantes não há diferença significativa entre os estágios de maturidade quanto ao teor de açúcares totais no tecido locular. No entanto, os teores de açúcares totais tanto do pericarpo quanto do tecido locular são significativamente menores nos frutos mutantes do que em frutos normais. Os açúcares e ácidos orgânicos têm importante papel no sabor do fruto interferindo na sua qualidade; no presente trabalho observou-se que os

frutos mutantes possuem menor quantidade de açúcares solúveis totais e, segundo MOURA (1999), estes apresentaram maior acidez titulável quando comparados com frutos normais. Podemos então concluir que a mutação alterou o sabor dos frutos e portanto sua qualidade final.

Quadro 3. Teores de açúcares solúveis totais no pericarpo e no tecido locular (mg de glicose g MF⁻¹) de frutos da variedade Santa Clara (SC) e seu mutante natural 'Firme' (MT) nos estádios de maturidade 1 a 6.

| Estádio de maturidade | Açúcares solúveis totais no pericarpo (mg de glicose g MF ⁻¹) | | Açúcares solúveis totais no tecido locular (mg de glicose g MF ⁻¹) | |
|-----------------------|--|-------------|---|-----------|
| | SC | MT | SC | MT |
| | 1 | 19,91 abc A | 19,04 abc A | 23,64 b A |
| 2 | 16,04 c B | 22,27 ab A | 18,19 c A | 18,06 a A |
| 3 | 16,94 bc B | 23,42 a A | 24,68 b A | 18,88 a B |
| 4 | 21,80 ab A | 18,36 abc B | 30,25 a A | 18,53 a B |
| 5 | 23,53 a A | 16,27 c B | 31,61 a A | 18,40 a B |
| 6 | 23,78 a A | 17,55 bc B | 23,87 b A | 20,86 a A |

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Segundo MOURA (1999), as plantas mutantes apresentam folhas mais amareladas do que as plantas normais e com senescência precoce. Em análises de clorofila realizadas nessas folhas observou-se um menor teor de clorofila em folhas localizadas nas regiões mediana e basal da planta mutante quando comparada à planta normal. HOBSON & DAVIES (1971) apresentam

dados que atestam que o sombreamento e a retirada de folhas do tomateiro têm um efeito adverso no teor de açúcares dos frutos produzidos. Uma vez que o acúmulo de açúcares está intimamente relacionado com a capacidade fotossintética das folhas, o menor teor de açúcares totais encontrados tanto no pericarpo quanto no tecido locular em frutos mutantes pode ser, pelo menos em parte, explicado pelo menor teor de clorofila nas folhas. A redução da quantidade de açúcares nos frutos mutantes com o amadurecimento pode também estar relacionada a utilização deste açúcar como fonte de energia em outras partes da planta, principalmente frutos novos, uma vez que as folhas mais velhas além de apresentarem teores mais baixos de clorofila apresentam também senescência precoce, reduzindo a capacidade fotossintética do conjunto de folhas que fornece fotoassimilados ao cacho de tomates e, deste modo, os frutos mais jovens podem atuar como dreno dos frutos mais velhos.

4.0 - CONCLUSÕES

Os frutos mutantes apresentaram respiração menos intensa e menor produção de etileno em todos os estádios de maturidade.

A atividade da oxidase do ACC apresentou padrão de comportamento distinto durante o amadurecimento na planta de frutos mutantes e normais, no entanto, apresentaram mesma magnitude de atividade, excluindo-se então a hipótese de que a mutação estaria atuando nesta enzima de modo a reduzir a quantidade de etileno produzida pelos frutos mutantes.

A mutação provoca atraso no aumento da atividade da enzima poligalacturonase, que possivelmente é o responsável pela maior firmeza dos frutos mutantes em relação aos normais.

Frutos mutantes apresentaram teores de açúcares solúveis totais menores em estádios mais avançados de maturidade quando comparados com frutos no início do amadurecimento, devido possivelmente à função temporária de fonte de energia para novos frutos em crescimento.

O pericarpo e o tecido locular de frutos mutantes apresentaram teores de açúcares solúveis totais menores em estádios mais avançados de amadurecimento do que os de tomates normais, possivelmente devido a menor capacidade de produzir fotoassimilados pelas plantas mutantes. Podemos então concluir que a mutação alterou o sabor dos frutos e portanto sua qualidade final.

5.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, D.P.F & HUBER, D.J. Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: A potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 506-512, 1999.
- BARRY, C.S.; BLUME, B.; BOUZAYEN, M.; COOPER, W.; HAMILTON, A.J.; GRIERSON, D. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. **The Plant Journal**, v. 9, n. 4, p. 525-535, 1996.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHUN, J-P. & HUBER, D.J. Polygalacturonase-mediated solubilization and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. Regulation by pH and ionic conditions. **Plant Physiology**, vol.117, p. 1293-1299, 1998.
- DALAL, K.B.; SALUNKHE, D.K.; BOE, A.A.; OLSON, L.E. Certain physiological and biochemical changes in the developing tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Food Science and Technology Journal**, , p.504-508, 1966.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- FERNANDEZ-MACULET, J.C. & YANG, S.F. Extraction and partial characterization of the ethylene-forming enzyme from apple fruit. **Plant Physiology**, v. 99, p. 751-754, 1992.
- HOBSON, G.E. & DAVIES, J.N. The tomato. IN: HULME, A.C. **The Biochemistry of fruits and their products**. Academic Press London, v. 2, cap. 13, p. 437-475, 1971.
- HOBSON, G.E. & GRIERSON, D. Tomato In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. (Ed.) **Biochemistry of fruit ripening**. 1^a ed. London, Chapman & Hall, p 405-442, 1993.
- HODGE, J.E. & HOFREITER, B.R. Determinations of reducing sugars and carbohydrates. IN: WILSTER, R.L.; WOLFROM, M.L. (Eds), **Methods in**

- carbohydrate chemistry**, Vol. 1. Academic Press, New York, p. 380-394, 1962.
- HUBER, D.J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural Review**, v. 5, p. 169-219, 1983.
- HUBER, D.J. & O'DONOGHUE, E.M. Polyuronides in avocado (*Persea americana* L.) and tomato fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. **Plant Physiology**, v. 102, p. 473-488, 1993.
- KLEE, H.J.; HAYFORD, M.B.; KRETZMER, K.A.; BARRY, G.J.; KISHORE, G.M. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1187-1193, 1991.
- LABAVITCH, J.M. Cell wall turnover in plant development. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 32, p. 385-406, 1981.
- MOURA, M.A. **Crescimento e pós-colheita de frutos do tomateiro cv. Santa Clara e do seu mutante firme**. Viçosa: UFV, 1999. 86 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- MOURA, M.L.; MOURA, M.A.; PINTO, C.M.F.; FINGER, L.F. Amadurecimento de frutos de tomateiro cv. Santa Clara e de seu mutante natural 'Firme'. **Revista Brasileira de Armazenamento**, 2002. (no prelo)
- SCHUELTER, A.R. **Análise genética e da pós-colheita de um mutante de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Viçosa: UFV, 1999. 135 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.

- SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; FINGER, F.L.; CRUZ, C.D.; COELHO, A.D.F. Analysis of mendelian segregation in a natural occurred tomato mutant. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 217, 1998a.
- SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; FINGER, F.L.; SPRITZE, A.L. Herança de um mutante de tomate que condiciona modificações em características morfológicas e fisiológicas. **Horticultura Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 96. 1998b.
- SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; CRUZ, C.D.; FINGER, F.L.; AMARAL JÚNIOR, A.T. do; SHIMOYA, A. Biometrical analysis of a mutant that increases shelf-life of tomato fruits. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, n.1, p. 44-53, 2001.
- SITRIT, Y. & BENNETT. A.B. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: A re-examination. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1145-1150, 1998.
- SMITH, C.J.S.; SLATER, A.; GRIERSON, D. Rapid appearance of an mRNA correlated with ethylene synthesis encoding a protein of molecular weight 35,000. **Planta**, v. 168, p. 94-100, 1986.
- SU, L.Y.; LIU, Y.; YANG, S.F. Relationship between 1-aminocyclopropane-1-carboxylate malonyltransferase and D-aminoacid malonyltransferase. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1141-1145, 1985.
- TERAI, H. & MIZUNO, S. Changes of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ethylene forming enzyme activity in growing and ripening of tomato and cucumber. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Sciences**, v. 53, p. 467-473, 1985.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **United States standards for grades of fresh tomatoes.** Washington DC, United States Department of Agriculture, 11pg. 1976.

WINSOR, G.W.; DAVIES, J.N.; MASSEY, D.M. Composition of tomato fruit. III. Juices from whole fruit and locules at different stages of ripeness. **Journal of Science, Food and Agriculture**, v. 13, p. 108-115, 1962.

APÊNDICE

Quadro 1. Resumo da análise de variância conjunta das variáveis açúcares solúveis totais no pericarpo (AT-P) e no tecido locular (AT-L), atividade da oxidase do ACC (ACC), atividade da poligalacturonase (PG) e firmeza (FIR) em função de variedades (V) e estágio de maturidade (EST).

| F.V. | G.L. | QUADRADOS MÉDIOS | | | | |
|---------|------|----------------------|----------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| | | AT-P | AT-L | ACC | PG | FIR |
| V | 1 | 8,61 ^{n.s.} | 446,11** | 232,23 ^{n.s.} | 0,74 ^{n.s.} | 3,93 ^{n.s.} |
| EST | 5 | 2,29 ^{n.s.} | 47,03** | 14197,40** | 646,63** | 152,63** |
| V*EST | 5 | 72,19** | 55,59** | 4429,34** | 7,20 ^{n.s.} | 23,43 ^{n.s.} |
| RESÍDUO | 36 | 6,93 | 6,34 | 394,97 | 6,83 | 9,91 |
| CV (%) | | 13,22 | 11,28 | 15,16 | 33,78 | 23,67 |

* F significativo a 1% de probabilidade

^{n.s.} F não significativo

Quadro 2. Resumo da análise de variância conjunta das variáveis produção de etileno e taxa respiratória em função de variedades (V) e estágio de maturidade (EST).

| F.V. | G.L. | QUADRADOS MÉDIOS | |
|---------|------|---------------------|-------------------|
| | | Produção de etileno | Taxa respiratória |
| V | 1 | 175,02 ** | 921,64** |
| EST | 5 | 117,77** | 170,90** |
| V*EST | 5 | 3,70** | 101,93** |
| RESÍDUO | 24 | 0,06 | 0,46 |
| CV(%) | | 2,49 | 1,94 |

* F significativo a 1% de probabilidade

ARTIGO 3

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE ETILENO NO AMADURECIMENTO PÓS-
COLHEITA DE FRUTOS DE TOMATE CV. SANTA CLARA E SEU MUTANTE
NATURAL 'FIRME'**

RESUMO

Na região produtora de hortaliças de Viçosa, MG, identificaram-se plantas de tomate 'Santa Clara' cujos frutos apresentam coloração "amarelo-creme" quando imaturos, menor tamanho e pericarpo menos espesso, amadurecimento tardio e período de amadurecimento mais prolongado quando ligados à planta mãe, e frutos mais firmes. Com o objetivo de estudar o efeito de diferentes doses de etileno sobre o amadurecimento de tomates e analisar o possível efeito desta mutação sobre a sensibilidade do tecido ao etileno, frutos do 'Santa Clara' e seu mutante 'Firme' foram selecionados quanto ao estágio de maturidade, e aqueles no estágio 1 (frutos que atingiram seu máximo de crescimento e ainda não apresentavam nenhum indício de cor vermelha), foram acondicionados em câmaras em atmosferas contendo 0, 100, 1.000 e 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno, por 36 horas, e depois transferidos para atmosfera normal. As mudanças fisiológicas características do amadurecimento dos frutos de tomate, como a perda de firmeza e a mudança de cor, foram influenciadas de maneira semelhante pela aplicação de etileno exógeno tanto para frutos normais como para frutos mutantes, o que indica que a sensibilidade do tecido ao etileno não foi alterada pela mutação. Os frutos mutantes apresentaram

atraso na produção autocatalítica de etileno em relação aos frutos normais após a aplicação de etileno exógeno. A menor dose de etileno, $100 \mu\text{L L}^{-1}$, foi suficiente para acelerar o amadurecimento dos frutos do cv. Santa Clara, assim como de seu mutante natural 'Firme'.

ABSTRACT

'Santa Clara' tomato plants with smaller and firmer fruits showing a pale-yellow color when immature, thick pericarp, a delay on ripening onset, and longer ripening period when attached to the plant were found in Viçosa, MG. Mature green 'Santa Clara' and mutant 'Firm' fruits were selected to study the effect of exogenous ethylene application on tomato ripening and its effect on tissue ethylene-sensibility. Fruits were held in chambers containing 0, 100, 1.000 e $10.000 \mu\text{L L}^{-1}$ of ethylene in its atmospheres for 36 hours and then transferred to normal atmosphere to ripen. Physiological changes during tomato fruit ripening, such as firmness loss and color change, were effected in a similar way by application of exogenous ethylene on mature green fruit stored at room temperature for mutant and wild type fruit, indicating that mutation did not change tissue ethylene sensitivity. Mutant fruit showed a delay on autocatalytic ethylene production after application of exogenous ethylene when compared to 'Santa Clara' fruit. The lower ethylene concentration studied, $100 \mu\text{L L}^{-1}$, enhanced ripening of 'Santa Clara' and 'Firme' fruits.

1.0 - INTRODUÇÃO

A qualidade do tomate depende de sua aparência, cor, firmeza, aroma e sabor. Estas características são distintas entre frutos colhidos verdes e aqueles colhidos vermelhos. Consideram-se de ótima qualidade frutos que têm todo o processo de amadurecimento na planta, isto é, colhido no estágio totalmente vermelho (NAKHASI et al., 1991). No entanto, tomates vermelhos são muito suscetíveis a danos durante o transporte e comercialização e, portanto, não resistem ao rigor do sistema de manuseio pós-colheita. Para reduzir as perdas pós-colheita, uma das práticas comerciais utilizadas é a colheita de frutos no estágio verde-maduro e posterior aplicação de etileno, para dar prosseguimento ao amadurecimento. Esse esquema permite maior flexibilidade ao sistema de comercialização, reduz o número de colheitas, permite uma vida de prateleira mais longa ao produto e minimiza os danos físicos durante o manuseio, favorecendo o transporte em longas distâncias (SARGENT, 1995) .

No Brasil, principalmente no estado de Minas Gerais, uma das cultivares mais produzidos de tomate é a Santa Clara. Na região produtora de hortaliças de Viçosa, MG, foram identificadas plantas de tomate deste cultivar cujos frutos apresentam coloração “amarelo-creme” quando imaturos, menor tamanho e pericarpo menos espesso, amadurecimento tardio e período de amadurecimento mais prolongado quando ligados à planta mãe, e frutos mais firmes (MOURA, 1999; MOURA et al., 2002). Esta mutação foi considerada estável, visto que a geração seguinte apresentou 100% de frutos semelhantes aos progenitores (SCHUELTER, 1999). Os frutos mutantes, enquanto ligados à planta, apresentam atraso na produção autocatalítica de etileno e, quando

amadurecidos fora da planta, a produção de etileno é significativamente menor do que nos frutos normais (MOURA, 1999; MOURA et al., 2002). SCHUELTER et al. (1998a, b) demonstraram que apenas um gene recessivo controla esta mutação quanto ao seu efeito sobre as modificações na firmeza do fruto e as alterações na cor. Além disso, foram detectados efeitos pleiotrópicos, indicando que a mutação possivelmente afetaria processos regulatórios que controlam diferentes eventos do amadurecimento do fruto. Essas observações evidenciam que a ação do etileno na regulação dos processos ligados ao amadurecimento dos frutos mutantes possam ter sido alterados.

Não há dúvidas de que o etileno tem uma importância primordial no controle e coordenação do amadurecimento em frutos climatéricos. A interação entre o etileno e os processos de amadurecimento é freqüentemente explorada na produção comercial, com intuito de uniformizar ou acelerar o amadurecimento de frutos fisiologicamente maduros, como por exemplo em pêras (PUIG et al., 1996). No entanto, poucas são as informações na literatura sobre a concentração de etileno, o tempo de exposição e o modo de aplicação deste que promova a aceleração do amadurecimento de tomates, principalmente para as condições do Brasil. A utilização comercial do etephon (ácido 2-cloro-etil-fosfônico), que em contato com pH próximo ao neutro no interior das células libera etileno, é amplamente difundida em países como os Estados Unidos. BIALE & YANG (1981) observaram que para a indução do amadurecimento de frutos de tomateiro é necessária uma concentração interna de etileno de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$, no entanto, não há informações sobre a concentração de etileno gasoso necessária e o tempo de exposição ao mesmo, que venham a promover a aceleração do amadurecimento de tomates.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de etileno sobre o amadurecimento de frutos do cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme' e analisar o possível efeito desta mutação sobre a sensibilidade do tecido ao etileno.

2.0 - MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de tomateiro cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme' foram colhidos pela manhã na horta da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, transportados para o laboratório de pós-colheita do Departamento de Fitotecnia da UFV, lavados em água corrente, para retirada de sujidades, e mergulhados em água clorada ($1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ de hipoclorito de sódio) por 1 minuto, para desinfecção da superfície dos frutos. Os frutos foram então selecionados quanto à uniformidade de tamanho, ausência de defeitos e ao estágio de maturidade.

Os tomates no estágio de maturidade 1, segundo a escala de cor do USDA (1976), que atingiram seu máximo de crescimento e ainda não apresentavam nenhum indício de cor vermelha na epiderme, foram acondicionados em câmaras herméticas sob sistema fechado (Figura 1), 5 frutos por câmara num total de 4 câmaras por tratamento, em atmosferas contendo 0, 100, 1.000 e 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno gasoso, a temperatura ambiente ($19 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). O ar no interior das câmaras permanecia em movimento devido a instalação de um miniventilador. A cada 12 horas, num total de 36 horas, era feita a exaustão das câmaras por 10 minutos e posteriormente as

atmosferas eram restabelecidas. Em seguida, os frutos foram transferidos para atmosfera normal à temperatura ambiente ($19 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), por um período de 10 dias, e as alterações de cor e firmeza foram avaliadas durante o amadurecimento dos frutos. Os dados obtidos em 10 dias de observações para as variáveis cor e firmeza foram analisados através de regressões ajustadas das doses de etileno em função do tempo de armazenamento em dias.

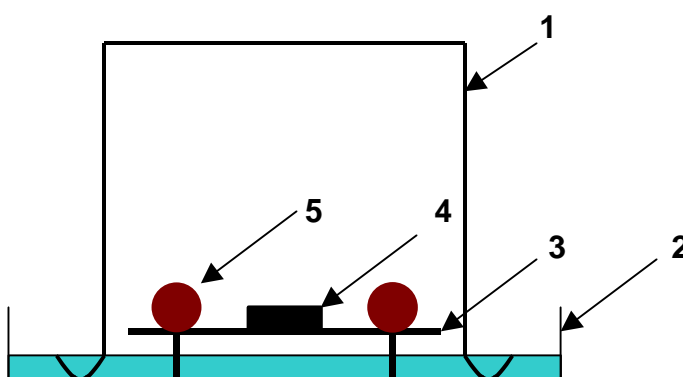


Figura 1: Representação gráfica da câmara onde os frutos de tomateiro ‘Santa Clara’ e ‘Firme’ eram acondicionados para aplicação de etileno gasoso. 1) balde de plástico de 20 L; 2) bacia de polietileno com 3 L de água; 3) suporte de madeira para os frutos; 4) mini-ventilador; 5) tomate.

A firmeza dos frutos foi avaliada mediante o método de aplanção descrito por CALBO & NERY (1995) para fruto inteiro. As medidas foram feitas na região equatorial do fruto e os dados obtidos transformados em unidade de força (MPa). As mudanças na coloração da epiderme foram medidas em câmara escura com um colorímetro manual (modelo Chromatopac C-R6A, Shimadzu Corporation). As medidas foram feitas na região apical do fruto e

avaliadas mediante os valores de 'L' 'a' 'b' de Hunter, onde 'L' refere-se à intensidade da luz (valores maiores: mais escuro), 'a' à cromaticidade em um eixo que vai de verde (-) ao vermelho (+), e 'b' à cromaticidade em um eixo que vai do azul (-) ao amarelo (+) (Fancis, 1970).

Para a determinação da produção de etileno e da taxa respiratória durante o amadurecimento dos frutos foi utilizado o sistema aberto de aplicação de etileno (fluxo contínuo), sendo a dose de etileno estudada a de $100 \mu\text{L L}^{-1}$. Frutos de tomateiro cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme' foram colhidos pela manhã na estação experimental da Universidade da Florida (UF), Quincy, Florida, EUA, transportados para o laboratório de pós-colheita do Departamento de Horticultura da UF, Gainesville, FL, lavados em água corrente, para retirada de sujidades, e mergulhados em água clorada ($1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ de hipoclorito de sódio) por 1 minuto, para desinfecção da superfície dos frutos. Os frutos foram então selecionados quanto à uniformidade de tamanho, ausência de defeitos e ao estágio de maturidade. Os tomates no estágio 1 de maturidade, que atingiram seu máximo de crescimento e ainda não apresentavam nenhum indício de cor vermelha na epiderme, foram acondicionados em câmaras de fluxo contínuo em atmosferas contendo 0 e $100 \mu\text{L L}^{-1}$ de etileno gasoso, a 20°C , por 36 horas. Os frutos foram então transferidos para atmosfera normal a 20°C e as alterações na produção de etileno e CO_2 foram avaliadas durante o amadurecimento dos frutos (14 dias).

A produção de etileno e a taxa respiratória, representada pela produção de CO_2 , foram medidas a cada 2 dias retirando-se amostras de 0,5 mL e 1 mL, respectivamente, do espaço livre de frascos herméticos de volume igual a

0,465 L, onde os frutos eram acondicionados individualmente, durante um período total de 14 dias de armazenamento. A cada dia de análise eram analisados 6 frutos de cada tratamento. Para a determinação da produção de etileno, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se um cromatógrafo equipado com um detector de ionização de chama (modelo 5890, série II, Hewlett Packard, Avondale, PA) com uma coluna alumina de 60/80 mesh. Na determinação do CO₂ produzido durante o amadurecimento, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa em um cromatógrafo equipado com um detector de condutividade térmica (série 580, Gow Mac, Leigh Valey, PA) com uma coluna Poropak Q de 80/100 mesh.

Para efeito de análise estatística foram considerados dois experimentos com delineamento inteiramente casualizado, um para a cv. Santa Clara e outro para o mutante 'Firme', cada um com 2 tratamentos e 6 repetições, e feita a análise da variância conjunta das variáveis. As variáveis, independente da interação ter sido significativa ou não, tiveram suas médias comparadas utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O amadurecimento dos frutos é um processo complexo que envolve o aumento da respiração e da produção de etileno, mudanças de cor e perda de firmeza. A perda de firmeza é um processo que acompanha o amadurecimento de muitos frutos, inclusive o tomate, e é resultado de mudanças estruturais que ocorrem na parede celular. A parede celular é formada por 90 a 95% de carboidratos, entre eles as celuloses, hemiceluloses e pectinas, e 5 a 10% de

proteínas (HOBSON & GRIERSON, 1993). A associação das mudanças na estrutura das pectinas com o amadurecimento vem sendo extensivamente documentada em tomates (LABAVITCH, 1981; HUBER, 1983; HUBER & O'DONOGHUE, 1993). Essas mudanças envolvem a ação de enzimas como a poligalacturonase, que é a principal responsável pela perda de firmeza associada ao amadurecimento de frutos, e a pectinametilesterase, que determina a extensão em que a pectina está disponível à degradação pela poligalacturonase.

O etileno tem um importante papel na iniciação e prosseguimento do amadurecimento em tomates e sua biossíntese é regulada pela atividade de duas enzimas específicas, a sintase do ACC e a oxidase do ACC. Apesar da sintase do ACC ser considerada como limitante para a formação de etileno, a regulação da oxidase do ACC também é importante, especialmente quando a maturidade fisiológica do fruto é atingida (HOBSON & GRIERSON, 1993). Recentemente, estudos com tomates transgênicos, com gene antisense para a enzima sintase do ACC (ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico), sugeriram que o acúmulo de mRNA de poligalacturonase (PG) é regulado pelo etileno (SITIRIT & BENNETT, 1998). CHEN et al. (1997) estudando o efeito do etileno na uniformização do amadurecimento de pêras observaram que a aplicação de etileno acelerou o amolecimento, aumentou a atividade da sintase do ACC e a produção de etileno de frutos armazenados a 20 °C.

A aplicação 100 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno acelerou a perda de firmeza dos frutos 'Santa Clara' logo após as 36 horas de aplicação (Figura 2A). MOURA et al. (1998), estudando o efeito de diferentes doses de ethephon em tomates 'Santa Clara', observaram redução mais intensa da firmeza dos frutos

durante o amadurecimento dos frutos tratados em comparação com o controle. As doses de 100 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno gasoso testadas no presente trabalho foram as que promoveram maior aceleração na perda de firmeza, visto que a cada dia a mais de armazenamento houve maior redução na firmeza desses frutos em comparação com frutos mantidos em ar (Quadro 1). A aplicação de 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno gasoso em frutos normais não acelerou o amolecimento dos mesmos no primeiro dia após as 36 horas de aplicação; no entanto, esses frutos perderam mais firmeza do que os do controle ao longo do período de amadurecimento em atmosfera normal, que pode ser percebido pelo menor valor de firmeza ao final do experimento (Figura 2A). Por outro lado, os frutos mutantes apresentaram a perda de firmeza, característica do processo de amadurecimento, acelerada pela aplicação de etileno exógeno em todas as doses estudadas (Figura 2B). De acordo com o Quadro 2, a dose de etileno de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ foi a que promoveu uma maior aceleração da perda de firmeza. Desta forma, pode-se inferir que a mutação provavelmente não interferiu no sistema receptor de etileno, visto que foi observado um efeito regulatório do etileno exógeno sobre a firmeza dos frutos mutantes, sabendo-se que a perda de firmeza dos frutos de tomate é regulada pelo etileno.

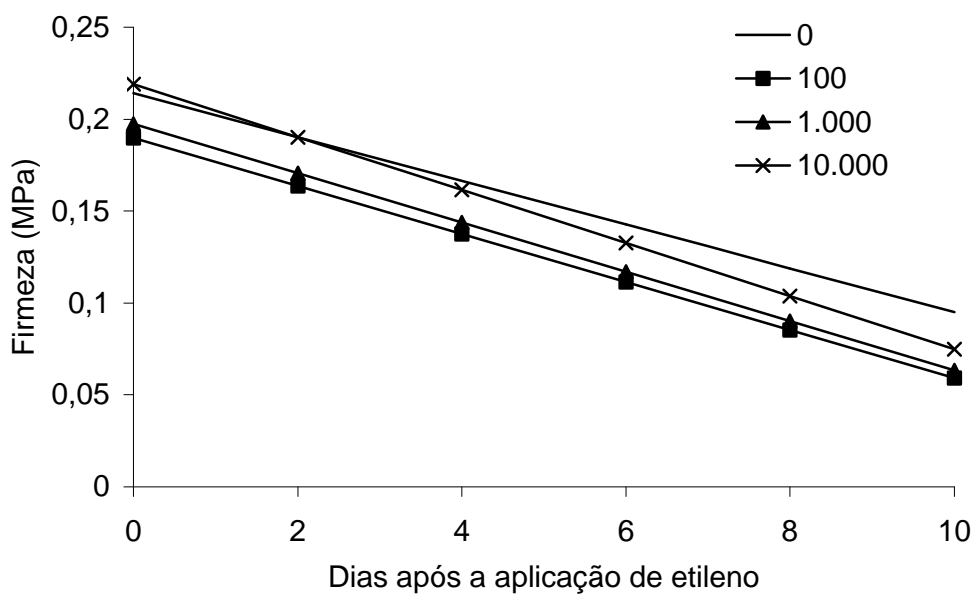
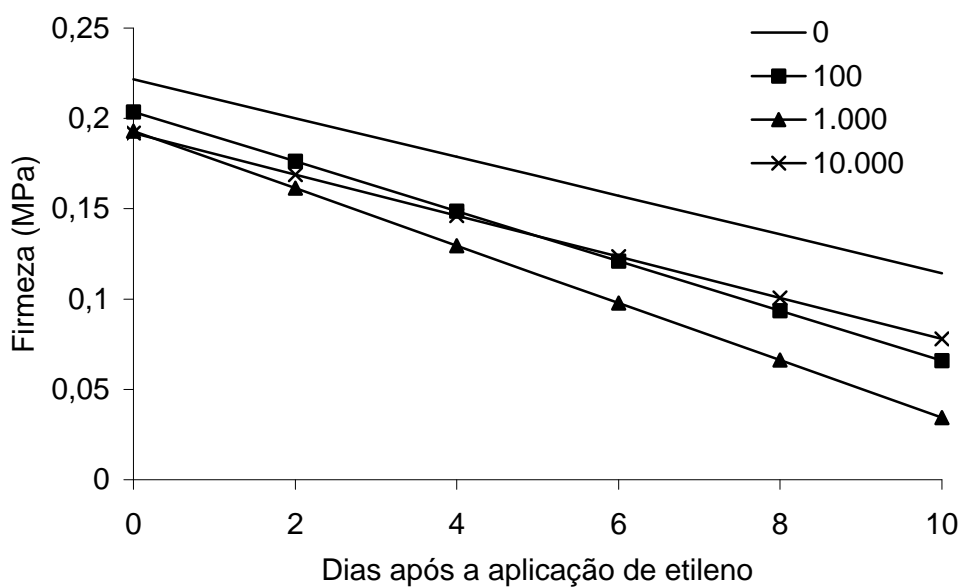
A**B**

Figura 2: Representação gráfica da perda da firmeza (MPa) de frutos do cv. Santa Clara (A) e de seu mutante natural 'Firme' (B) armazenados a 19 ± 2 °C em atmosfera normal por 10 dias, após terem sido submetidos por um período de 36 horas em atmosferas contendo 0, 100, 1.000 e 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno gasoso.

Quadro 1: Equações de regressão ajustadas para as variáveis firmeza (MPa) e cor, representadas pelos valores de 'L' e 'a', nas 4 doses de etileno ($\mu\text{L L}^{-1}$) em função de dias de armazenamento a 19 ± 2 °C em atmosfera normal, de frutos cv. Santa Clara tratados com etileno por 36 horas no estágio 1 de maturidade.

| Variável | Etileno | Equação de regressão ajustada | r^2 |
|----------|---------|---|--------|
| Firmeza | 0 | $Y = 0,214049 - 0,0118929X$ ** | 0,9724 |
| | 100 | $Y = 0,189903 - 0,0130870X$ ** | 0,9704 |
| | 1.000 | $Y = 0,197514 - 0,0134280X$ ** | 0,9510 |
| | 10.000 | $Y = 0,219080 - 0,014409X$ ** | 0,9511 |
| 'L' | 0 | $Y = 35,5878 - 0,63555X$ ** | 0,9304 |
| | 100 | $Y = 37,7811 - 1,07850 X$ ** | 0,8424 |
| | 1.000 | $Y = 31,6461 - 0,704178X$ * | 0,7022 |
| | 10.000 | $Y = 34,8477 + 1,10273X - 0,188447X^2$ * | 0,9368 |
| 'a' | 0 | $Y = -19,7065 + 2,84089X$ * | 0,7436 |
| | 100 | $Y = -23,0566 + 3,95586$ * | 0,7243 |
| | 1.000 | $Y = -6,97781 + 2,77597X$ ** | 0,8794 |
| | 10.000 | $Y = -15,4529 - 3,32472X + 0,674398X^2$ * | 0,9005 |

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste "t"

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste "t"

Assim como a perda de firmeza, a mudança de cor dos frutos é uma das características do processo de amadurecimento. A alteração da coloração do fruto normalmente envolve a degradação da clorofila e a síntese de pigmentos carotenóides, principalmente o licopeno no caso do tomate, à medida em que os cloroplastos são transformados em cromoplastos. Segundo JEFFERY et al. (1984), a produção de licopeno e a degradação da clorofila, características do amadurecimento dos frutos de tomates, são dependentes do etileno. A utilização de um método físico de medida de cor, no entanto, provê um modo mais acessível e rápido de mensurar e avaliar as alterações durante o

amadurecimento dos frutos do que a análise de pigmentos, e está mais relacionada com a percepção visual, que é uma das formas com que os consumidores avaliam a qualidade de um produto.

Segundo SHEWFELT et al. (1988), os frutos de tomate durante o seu amadurecimento normal apresentam alterações da cor representadas por valores decrescentes de 'L', indicando um escurecimento continuado da epiderme dos frutos com o avanço do amadurecimento; valores de 'a' crescentes, partindo de valores negativos nos primeiros estádios de maturidade para positivos nos estádios mais avançados, indicando a mudança da coloração verde para a vermelha. Os valores de 'b', no entanto, não são relevantes neste trabalho, uma vez que a cor predominante no final do amadurecimento dos frutos 'Santa Clara' e 'Firme' é a vermelha.

Nos frutos da cv. Santa Clara a aplicação de etileno teve comportamento semelhante ao controle nas doses de 100 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ para a variável 'L', demonstrado pela regressão linear significativa nestes três tratamentos, apesar de a dose de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ promover maior aceleração do escurecimento dos frutos (Quadro 1). A aplicação de 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno, por sua vez, promoveu um comportamento diferente dos demais tratamentos, uma vez que a equação de regressão que melhor descreveu este comportamento foi a quadrática, como pode ser observado no Quadro 1. Pode-se observar pelos dados do Quadro 2 que os frutos mutantes, após a aplicação de 0 e 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno por 36 horas, apresentaram comportamento semelhante durante o armazenamento; no entanto, a dose de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ promoveu maior aceleração no escurecimento da epiderme, alcançando

valores de 'L' menores do que o controle no final de 10 dias (Figura 3B). Os frutos tratados com 1.000 e 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno apresentaram comportamento diferente do de frutos tratados em atmosfera sem etileno. Esta diferença foi significativa e pode ser observada no Quadro 2, onde a equação que melhor descreveu o comportamento dos tratamentos 1.000 e 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno foi a linear enquanto que para os frutos controle foi a quadrática.

Quadro 2: Equações de regressão ajustadas para as variáveis firmeza (MPa) e cor, representada pelos valores de 'L' e 'a', nas 4 doses de etileno ($\mu\text{L L}^{-1}$) em função de dias de armazenamento a 19 ± 2 °C em atmosfera normal, de frutos mutante 'Firme' tratados com etileno por 36 horas no estágio 1 de maturidade.

| Variável | Etileno | Equação de regressão ajustada | r^2 |
|----------|---------|--|--------|
| Firmeza | 0 | $Y = 0,221512 - 0,0107033X$ ** | 0,9568 |
| | 100 | $Y = 0,203762 - 0,0137911X$ ** | 0,9702 |
| | 1.000 | $Y = 0,193134 - 0,0158829X$ ** | 0,9872 |
| | 10.000 | $Y = 0,191794 - 0,0113934X$ ** | 0,9409 |
| 'L' | 0 | $Y = 42,9830 + 1,22394X - 0,267262X^2$ * | 0,9458 |
| | 100 | $Y = 43,8557 + 0,292850X - 0,227195X^2$ ** | 0,9989 |
| | 1.000 | $Y = 47,0627 - 2,87067X$ ** | 0,9548 |
| | 10.000 | $Y = 44,4700 - 1,86039X$ ** | 0,9447 |
| 'a' | 0 | $Y = -29,4740 + 3,36293X$ * | 0,7592 |
| | 100 | $Y = -28,6693 + 4,33618X$ ** | 0,8879 |
| | 1.000 | $Y = -25,4766 + 5,27581X$ ** | 0,9455 |
| | 10.000 | $Y = -24,3006 + 4,52942X$ ** | 0,9597 |

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste "t"

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste "t"

Nas Figuras 3A e 3B pode-se observar a tendência geral da coloração da epiderme tanto para os frutos do cultivar Santa Clara como para os mutantes que, independente da dose de etileno aplicada, foi de redução dos valores de 'L' ao final do experimento, indicando que o fruto mutante tem comportamento semelhante ao normal quanto ao escurecimento da epiderme.

Em frutos 'Santa Clara', a aplicação de 100 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno por 36 horas promoveu comportamento semelhante aos frutos armazenados sem etileno pelo mesmo período de tempo, quanto aos valores de 'a', que representam a mudança da cor da epiderme de verde para vermelha, mostrado no Quadro 1 pelo aumento linear desses valores com o tempo, enquanto que após o tratamento com 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, apesar de observar-se aumento nos valores de 'a', os frutos apresentaram comportamento diverso dos demais tratamentos. A dose que mais rapidamente acelerou o amadurecimento dos frutos da cultivar Santa Clara foi a de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno, como pode ser observado na Figura 4A, evidenciado pela transição de valores negativos para positivos. Enquanto esta transição ocorreu entre o sexto e o oitavo dia para as demais doses, a dose de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno promoveu essa transição já no segundo dia de armazenamento.

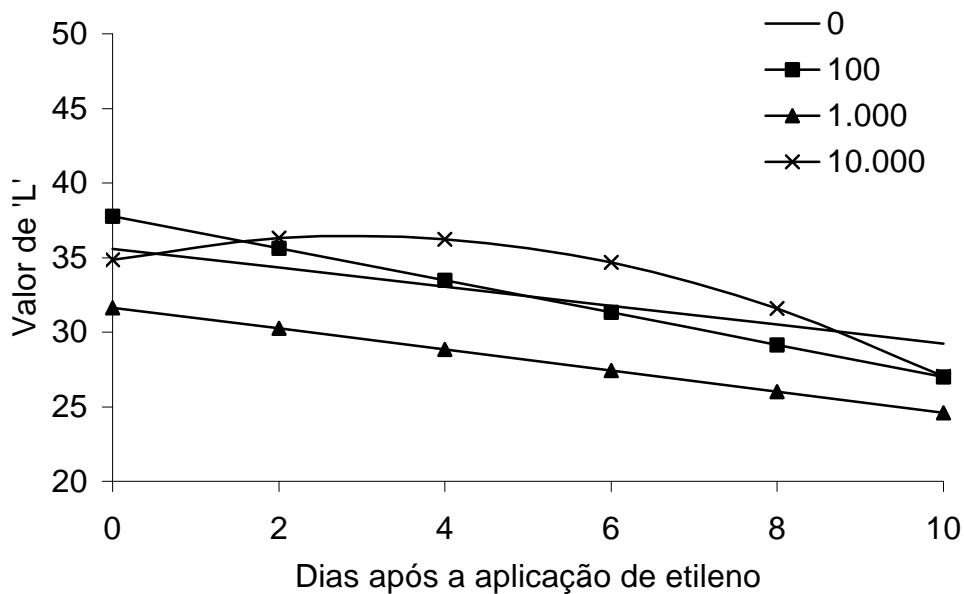
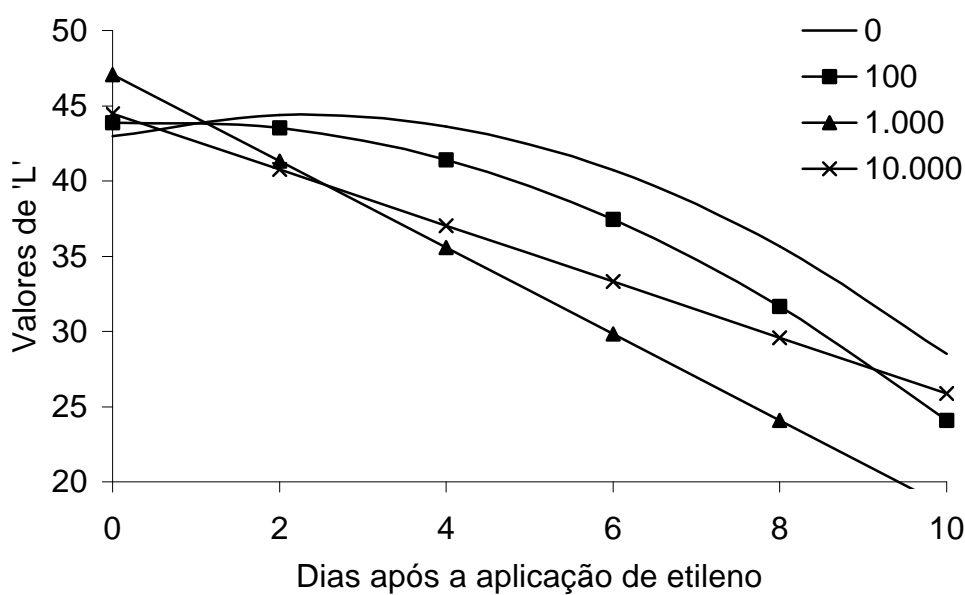
A**B**

Figura 3: Representação gráfica da mudança da intensidade de cor, indicada pelos valores de 'L', de frutos do cv. Santa Clara (A) e de seu mutante natural 'Firme' (B) armazenados a 19 ± 2 °C em atmosfera normal por 10 dias, após terem sido submetidos por um período de 36 horas a atmosferas contendo 0, 100, 1.000 e 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno gasoso.

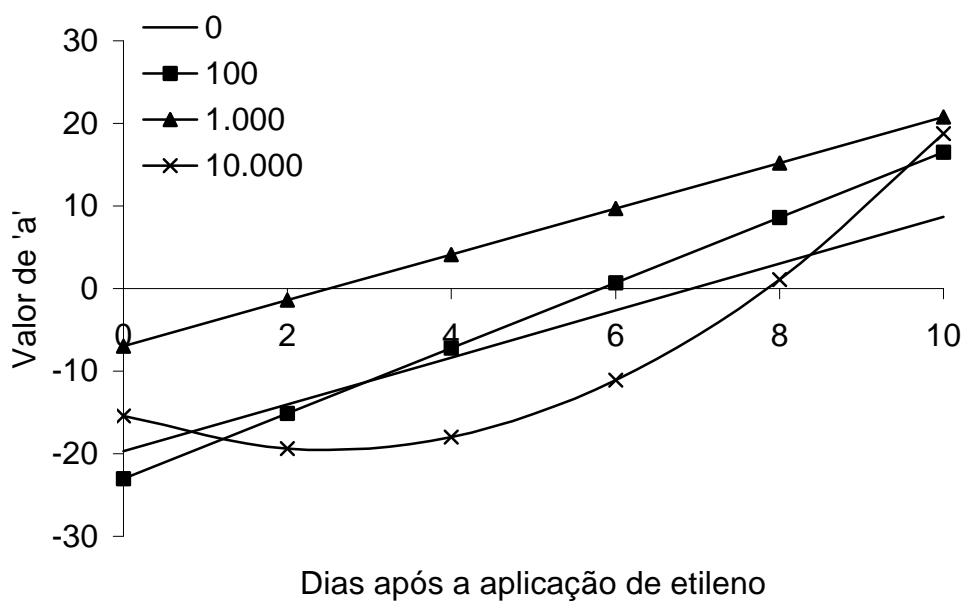
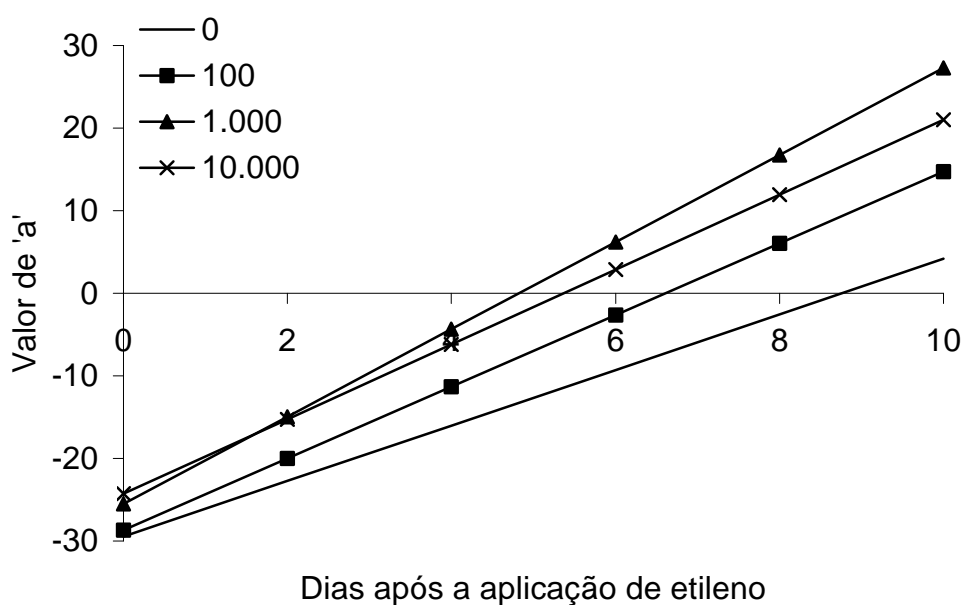
A**B**

Figura 4: Representação gráfica da mudança da cor verde para a vermelha, indicada pelos valores de 'a', de frutos do cv. Santa Clara (A) e de seu mutante natural 'Firme' (B) armazenados a 19 ± 2 °C em atmosfera normal por 10 dias, após terem sido submetidos por um período de 36 horas a atmosferas contendo 0, 100, 1.000 e 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno gasoso.

No Quadro 2, pode-se observar comportamento semelhantes dos frutos mutantes após os tratamentos com 0, 100, 1.000 e 10.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, quanto aos valores de 'a', representado por um aumento linear dos valores de 'a' em todos os frutos independente do tratamento utilizado. A dose de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno, no entanto, foi a que promoveu a maior aceleração da mudança de cor da epiderme de verde para vermelha, que pode ser observada pela antecipação na transição dos eixos negativo para o positivo, indicando uma maior aceleração do amadurecimento nesses frutos (Figura 4B).

A tendência geral da mudança de coloração indicada pelos valores de 'a' tanto para os frutos do cv. Santa Clara como para seu mutante foi a mesma descrita por SHEWFELT et al. (1988). No entanto, como pode ser observado nas Figuras 4A e 4B, o aparecimento e predominância da cor vermelha, que é representada pela passagem de valores de 'a' negativos para positivos, acontece mais tardiamente nos frutos mutantes quando comparada aos frutos normais, independente do tratamento aplicado.

No Quadro 3 pode-se observar o efeito do tratamento de frutos 'Santa Clara' e 'Firme' com 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno gasoso por 36 horas sobre a taxa respiratória e a produção de etileno durante o amadurecimento em atmosfera normal. Os resultados apresentados mostram que nos frutos normais, após a aplicação de etileno, a produção de etileno autocatalítico assim como a taxa respiratória apresentaram um pico no segundo dia de armazenamento enquanto que sem a aplicação de etileno o pico de produção foi no dia 4. Além disso, os valores alcançados nos picos de produção de etileno foram maiores nos frutos em que houve a aplicação exógena de etileno, sendo que não foi

encontrada diferença significativa quanto à produção máxima de CO₂, apesar de observarem-se valores menores em frutos tratados com etileno. Essa maior produção de etileno em frutos tratados com etileno exógeno também foi observada por ATTA-ALY et al. (2000) que, estudando o efeito da aplicação de etileno no amadurecimento do tecido locular de tomate cv. Sunny, observaram um aumento da produção de etileno quando os tecidos eram tratados com etileno exógeno.

Em frutos mutantes, observou-se que o pico de produção de etileno ocorreu no quinto dia, para frutos mantidos em ar, atingindo um valor de 9,25 L kg⁻¹h⁻¹, enquanto que frutos tratados com etileno atingiram produção máxima de 11,57 L kg⁻¹h⁻¹ no quarto dia; no entanto, esses valores não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (Quadro 3). A aplicação de etileno em frutos mutantes antecipou o pico de produção de CO₂ mas os valores alcançados foram menores; no entanto, essa diferença não foi significativa. Segundo HERNER & SINK Jr. (1973) e TIGCHELAAR et al. (1978) a aplicação de etileno exógeno estimula a respiração em tomates normais e mutantes.

Pode-se observar ainda no Quadro 3 que, apesar de os frutos mutantes e normais não apresentarem diferença significativa quanto ao tempo para atingir os picos de etileno e CO₂ sem a aplicação de etileno, após a aplicação de etileno os frutos normais atingiram o pico de produção autocatalítica de etileno e pico respiratório antes do que frutos mutantes também tratados com etileno.

Quadro 3: Valores médios das variáveis dias e magnitude dos picos de produção de CO₂ e de etileno durante o amadurecimento em câmara com temperatura controlada de 20 °C e atmosfera normal de tomates do cv. Santa Clara e seu mutante natural 'Firme' após a aplicação de 100 L L⁻¹ de etileno (C₂H₄) ou ar (Controle) por 36 horas em fluxo contínuo em frutos do estágio 1.

| | | Controle | C ₂ H ₄ |
|---|-------------|----------|-------------------------------|
| Tempo em dias para atingir o pico de produção de CO ₂ | Santa Clara | 4,0 aA | 2,0 bB |
| | Mutante | 4,3 aA | 3,7 aA |
| Magnitude do pico de produção de CO ₂ (mg CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹) | Santa Clara | 45,46 aA | 42,19 aA |
| | Mutante | 47,22 aA | 44,03 aA |
| Tempo em dias para atingir o pico de produção de etileno | Santa Clara | 4,3 aA | 2,0 bB |
| | Mutante | 5,2 aA | 4,0 aA |
| Magnitude do pico de produção de etileno (L kg ⁻¹ h ⁻¹) | Santa Clara | 9,59 aB | 12,46 aA |
| | Mutante | 9,25 aA | 11,57 aA |

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

4.0 - CONCLUSÕES

De um modo geral, os frutos mutantes apresentam uma menor taxa de amadurecimento do que os frutos normais, tendo em vista as mudanças fisiológicas características do amadurecimento dos frutos de tomate estudadas neste e em trabalhos anteriores. No entanto, essas alterações são influenciadas de maneira semelhante pela aplicação de etileno exógeno tanto para frutos normais como para frutos mutantes. A sensibilidade do tecido ao

etileno, portanto, não foi alterada pela mutação, o que indica que a mutação possivelmente não alterou o sistema de receptores de etileno.

A partir das informações obtidas neste trabalho podemos certificar que a menor dose testada, 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno, aplicada em frutos do estágio 1 de maturidade por 36 horas e exaustão de 10 minutos a cada 12 horas, foi suficiente para acelerar o amadurecimento dos frutos da cv. Santa Clara assim como de seu mutante natural 'Firme'.

5.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTA-ALY, M.A.; BRECHT, J.K.; HUBER, D.J. Ripening of tomato fruit locule gel tissue in response to ethylene. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, p. 239-244, 2000.

BIALE, J.B. & YOUNG, R.E. Respiration and ripening in fruits – retrospect and prospect. In: FRIEND, J.; RHODES, M.J.C. (Eds.) **Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables**. London, Academic Press, p. 1-37, 1981.

CALBO, A.G. & NERY, A.A. Medida de firmeza em hortaliças pela técnica de aplanção. **Horticultura Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 14-18, 1995.

CHEN, P.M.; VARGA, D.M.; FACTEAU, T.J. Promotion of ripening of 'Geghard' red 'd'Anjou' pears by treatment with ethylene. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, p. 213-220, 1997.

HERNER, R.C. & SINK Jr., K.C. Ethylene production and respiratory behavior of the *rin* tomato fruit. **Plant Physiology**, v. 52, p. 38-42, 1973.

- HOBSON, G.E. & GRIERSON, D. Tomato In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. (Ed.) **Biochemistry of fruit ripening**. 1^a ed. London, Chapman & Hall, p. 405-442, 1993.
- HUBER, D.J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural Review**, v. 5, p. 169-219, 1983.
- HUBER, D.J. & O'DONOGHUE, E.M. Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. **Plant Physiology**, v. 102, p. 473-480, 1993.
- JEFFERY, D.; SMITH, C.; GOODENOUGH, P.; PROSSER, I.; GRIERSON, D. Ethylene-independent and ethylene-dependent biochemical changes in ripening tomatoes. **Plant Physiology**, v. 74, p. 32-38, 1984.
- LABAVITCH, J.M. Cell wall turnover in plant development. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 32, p. 385-406, 1981.
- MOURA, M.A. de; ZANIN, S.R.; FINGER, L.F. Amadurecimento de tomate com pulverização de diferentes doses de Ethephon associado com espalhante adesivo. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 23, n.1, p. 11-14, 1998.
- MOURA, M.A. **Crescimento e pós-colheita de frutos do tomateiro cv. Santa Clara e do seu mutante firme**. Viçosa: UFV, 1999. 86 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- MOURA, M.L; MOURA, M.A. de; PINTO, C.M.F.; FINGER, F.L. Amadurecimento de frutos do tomateiro cv. Santa Clara e do seu mutante natural 'Firme'. **Revista Brasileira de Armazenamento**, 2002 (No prelo)

- NAKHASI, S.; SCHLIMME, D.; SOLOMOS, T. Storage potential of tomatoes harvested at the breaker stage using modified atmosphere packaging. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 55-59, 1991.
- PUIG, L.; VARGA, D.M.; CHEN,P.M; MIELKE, E.A. Synchronizing ripening in individual 'Bartlett' pears with ethylene. **HortTechnology**, v. 6, n. 1, p. 24-27, 1996.
- SARGENT, S.A. **Developing a system for screening and handling premium quality tomatoes**. Horticultural Science Department. University of Florida, 1995. 2p. (Parecer técnico apresentado à Collier Farms, Inc., EUA).
- SCHUELTER, A.R. **Análise genética e da pós-colheita de um mutante de tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.)**. Viçosa: UFV, 1999. 135 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; FINGER, F.L.; CRUZ, C.D.; COELHO, A.D.F. Analysis of mendelian segregation in a natural occurred tomato mutant. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 217, 1998a.
- SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; FINGER, F.L.; SPRITZE, A.L. Herança de um mutante de tomate que condiciona modificações em características morfológicas e fisiológicas. **Horticultura Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 96 1998b.
- SHEWFELT, R.L.; THAI, C.N.; DAVIS, J.W. Prediction of changes in color of tomatoes during ripening at different constant temperatures. **Journal of Food Science**, v.53, p.1433-1437, 1988.

SITRIT, Y. & BENNETT, A.B. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: A re-examination. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1145-1150, 1998.

TIGCHELAAR, E.C.; McGLASSON, W.B.; FRANKLIN, M.J. Natural and etephon-stimulated ripening of F1 hybrids of the ripening inhibitor (*rin*) and non-ripening (*nor*) mutants of tomato. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 5, p. 449-456, 1978.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **United States standards for grades of fresh tomatoes**. Washington DC, United States Department of Agriculture, 11pg. 1976.

APÊNDICE

QUADRO 1. Resumo da análise de variância conjunta das variáveis produção de etileno (PC_2H_4), dias para o pico de etileno (DC_2H_4), taxa respiratória (TR) e dias para o pico de CO_2 (DCO_2) em função de variedades (V) e da dose de etileno aplicada (D).

| F.V. | G.L. | QUADRADOS MÉDIOS | | | |
|---------|------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------|
| | | PC_2H_4 | DC_2H_4 | TR | DCO_2 |
| V | 1 | 2,30 ^{n.s.} | 12,04 ** | 19,50 ^{n.s.} | 6,00** |
| D | 1 | 40,45 ** | 18,38** | 62,48 ^{n.s.} | 10,67** |
| V*D | 1 | 0,46 ^{n.s.} | 2,04 ^{n.s.} | 0,01 ^{n.s.} | 2,67** |
| RESÍDUO | 20 | 3,74 | 1,21 | 46,61 | 0,33 |
| CV (%) | | 18,04 | 28,37 | 15,27 | 16,50 |

* F significativo a 1% de probabilidade

^{n.s.} F não significativo

CONCLUSÕES GERAIS

Durante o amadurecimento na planta, frutos 'Santa Clara' apresentaram mudança de cor da epiderme mais gradual e menos intensa do que os frutos mutantes, com aumento nos teores de carotenóides totais e licopeno de mais de 20 vezes tanto para frutos normais como para frutos mutantes.

Os estudos de ultraestrutura evidenciaram que durante o amadurecimento de tomates 'Santa Clara' os cloroplastos pré-existentes sofrem diferenciação e se diferenciam em cromoplastos; por outro lado, no mutante 'Firme' a diferenciação em cromoplastos pode ocorrer inteiramente independente da presença de cloroplastos.

Os frutos mutantes, durante o amadurecimento na planta, apresentaram menor taxa respiratória e produção de etileno do que os frutos normais em todos os estádios de maturidade estudados. A atividade da oxidase do ACC apresentou padrão de comportamento distinto durante o amadurecimento na planta entre frutos mutantes e normais; no entanto, a magnitude da atividade foi a mesma para frutos normais e mutantes, excluindo-se então a hipótese de que a mutação estaria atuando nesta enzima de modo a reduzir a quantidade de etileno produzida pelos frutos mutantes.

A mutação provoca atraso no aumento da atividade da enzima poligalacturonase em frutos ligados à planta mãe, que possivelmente é o responsável pela maior firmeza dos frutos mutantes em relação aos normais.

Os frutos normais acumularam açúcares durante seu amadurecimento na planta, enquanto que em frutos mutantes foi observada a redução nos

teores de açúcares, devido possivelmente à função temporária de fonte de energia para novos frutos em crescimento. O pericarpo e o tecido locular de frutos mutantes apresentaram teores de açúcares totais menores do que os de tomates normais, possivelmente devido a uma menor capacidade de produzir fotoassimilados pelas plantas mutantes.

De um modo geral, quanto ao processo de amadurecimento fora da planta, os frutos mutantes apresentam menor taxa de amadurecimento do que os frutos normais, tendo em vista as mudanças fisiológicas características do amadurecimento dos frutos de tomate. No entanto, essas alterações foram influenciadas de maneira semelhante pela aplicação de etileno exógeno tanto para frutos normais como para frutos mutantes; a sensibilidade do tecido ao etileno, portanto, não foi alterada pela mutação, o que indica que a mutação possivelmente não alterou o sistema de receptores de etileno.

A partir das informações obtidas neste trabalho podemos certificar que a menor dose testada, $100 \mu\text{LL}^{-1}$ de etileno, aplicada em frutos do estágio 1 de maturidade por 36 horas, com exaustão de 10 minutos a cada 12 horas, foi eficaz em acelerar o amadurecimento dos frutos da cv. Santa Clara assim como de seu mutante natural 'Firme'.